

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE COELHOS COM
O ISOLADO MUTUM DE HERPESVIRUS BOVINO 5
(BoHV-5)**

HÉLIO MARTINS DE AQUINO NETO

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2008**

HÉLIO MARTINS DE AQUINO NETO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE COELHOS
COM O ISOLADO MUTUM DE
HERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV-5)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Elias Jorge Facury Filho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2008

A657i Aquino Neto, Hélio Martins de, 1980-
Infecção experimental de coelhos com o isolado Mutum de Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5)
/ Hélio Martins de Aquino Neto. - 2008.
78 p. : il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Herpesvírus em animais – Teses. 2. Vírus do herpes em animais – Teses. 3. Coelho
como animal de laboratório – Teses. 4. Meningoencefalite – Teses. I. Facury Filho, Elias Jorge.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

Dissertação defendida e aprovada em 31 de Janeiro de 2008, pela Comissão
Examinadora constituída por:



Prof. Dr. Elias Jorge Facury Filho
(Orientador)



Profª Dra. Milene Alvarenga Rachid



Profª Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli



Profª Dra. Erna Geessien Kroon

Dedico este trabalho aos meus pais,
Hélder e Nádia, meus irmãos Diogo,
Gabriela e Daniele e ao meu avô Hélio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar esta passagem terrena repleta de saúde, família, amigos, oportunidades e conhecimento, dando-me desta forma a capacidade de melhorar um pouquinho a cada dia, em todos os sentidos.

Aos meus pais Hélder e Nádia, meus irmãos Diogo, Gabriela e Daniele, e aos meus avós Hélio e Vanilda (*in memoriam*), Agnelo e Terezinha, pela educação, pelo incentivo, pelo amor, pela paciência, pela saudade... enfim por todos os sentimentos e atos que me permitiram estar aqui hoje.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), instituição onde me graduei em Medicina Veterinária, e a todos os professores que realmente se empenharam em vencer as dificuldades, contribuindo com minha formação pessoal e profissional. O professor Francisco Carneiro Lima é uma destas pessoas... Obrigado pelos ensinamentos, bons momentos, pela amizade e por acreditar somos capazes.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo caloroso acolhimento e inúmeras oportunidades concedidas.

Ao meu orientador, professor Lobão, e ao professor Último, que sempre estiveram presentes em todos os sentidos e dividiram desde o início as obrigações da minha orientação e da condução deste trabalho. Gostaria de ressaltar que este apoio não vem somente deste período do curso de Mestrado, mas desde a minha chegada em BH, ainda como estudante de graduação em 2002.

Aos professores Paulo Marcos e Lívio Molina, pelo apoio, amizade e por serem exemplos para mim de pessoas vencedoras. Meu muito obrigado por terem sempre me recebido de braços abertos!!

À professora Edel, por me receber e me fazer sentir um membro do seu laboratório, pelos ensinamentos, empenho, exemplo de profissional... Obrigado pela oportunidade de conhecer coisas novas e pela paciência (não deve ter sido fácil!!!) que me tem dispensado todo este tempo.

À minha namorada Lilian, por tudo que já vivemos e compartilhamos, e por ser peça fundamental na minha vida.

À professora Milene Alvarenga, pelo apoio, pela disponibilidade em nos atender sempre com muita simpatia e pela grande contribuição na determinação da metodologia deste trabalho.

À professora Marília, pelos conselhos, pela atenção e por sempre ter procurado facilitar ao máximo a resolução dos mais diversos problemas.

Ao professores Paulo e Fabíola e à residente Laura, pelo apoio sempre que necessitamos, e por realizarem as análises hematológicas deste trabalho.

À professora Rosa e à técnica Mirna, do NIPE – ICB, pelo apoio, atenção e por terem realizado as análises histológicas deste trabalho.

Ao professor Ronaldo Braga Reis, por ter gentilmente cedido os animais para este trabalho.

Ao doutorando Durval, pelo apoio e esclarecimentos em relação ao protocolo de coleta de sangue dos animais.

Aos companheiros do LABMIC-ICB: Jaque, Camila, Fernanda, Myrian, Haleta, Dani Afonso, Rafael, Matheus, Jordana, Juscelino, GioIvo, Milena, dentre outros, que me receberam com muita simpatia e sempre mostraram-se prontos a ajudar.

À Aline (doutoranda em patologia), pela amizade, simpatia e por sempre estar disposta a ajudar e esclarecer dúvidas.

Aos amigos Ângelo, Gordo (Sidney), Moisés, Rafael, Bel, Catarina, Mutum (ao vírus e ao residente Marcelo), Enxurrada, Nelson e Leo, que fazem parte da família da Clínica de Ruminantes e sempre estiveram presentes, em todos os sentidos.

Aos amigos Ivis, Sebá, Vinícios, Anali, Magão, Karla, Gaguinho, Modesto, Anderson Percebe, Adriana, Theonys, Sr. João, dentre muitos outros que, apesar da distância sempre estarão presentes na minha vida.

Aos amigos-irmãos Cupim (Fernando), Ferdinan e Talmir (Gudinho) pelo apoio constante, por compartilhar momentos bons e ruins, e por nossa república sempre ter sido um local de grande atividade sócio-intelecto-cultural!! Obrigado por tudo!

Ao Renato, da fazenda da Escola de Veterinária da UFMG em Igarapé, por todo o apoio durante o processo de seleção e transporte dos animais que foram utilizados no experimento.

Aos veterinários Drs. Pedro, Marcelo e Anapolino, do LANAGRO/MG por terem me recebido tão bem e facilitado de todas as formas a realização de parte fundamental deste experimento. Estendo minha gratidão também ao Bráulio e a todos os demais funcionários com quem tive contato e que muito me auxiliaram quando estive em Pedro Leopoldo.

Ao estudante de veterinária Ronaldo Alves, por todo o apoio durante a infecção dos animais em Pedro Leopoldo, por às vezes chegar seis horas da manhã e sair lá pelas onze ou meia noite... Tudo com muita boa vontade! Valeu mesmo! Sei que as necropsias teriam sido muito mais complicadas se você não tivesse me dado aquela força!

À Fábía pelo trabalho maravilhoso na preparação do inóculo viral (dentre muitas outras coisas!!!), pelos grandes ensinamentos, pela amizade, disposição, por ter sido pessoa fundamental para a realização desta pesquisa. Também gostaria de expressar minha gratidão à professora Zélia Lobato e à todas as pessoas da Preventiva que colaboraram conosco, entre eles Eduardo, Grazi, Cíntia, Iara e Doris.

À estudante de Ciências Biológicas, Ludmila Alves, que também foi peça fundamental para que alcançássemos nossas metas! Espero que você tenha noção do quanto foi importante e que serei sempre grato por ter se dedicado ao máximo a esta “causa” e ter compartilhado e observado minhas angústias e dificuldades nesta fase final, e agora, poder concluir que nada mais foi do que mais um obstáculo vencido, um grande aprendizado para todos nós!

À Nilda, por ser uma profissional exemplar e nos receber sempre com esta simpatia que lhe é peculiar. Sua habilidade em lidar com as pessoas é uma qualidade maravilhosa e certamente torna a vida de todos os estudantes de pós da Ciência Animal muito mais fácil!! Aproveito para agradecer também à Débora, pois apesar do pouco tempo na secretaria da pós, já demonstrou sua capacidade e competência, nos ajudando muito nesta fase final do curso de Mestrado.

À Fabíola, Alessandra, Fabiana, Léo e Awilson amigos desde a época da Residência e que compartilharam conosco esta trajetória no Mestrado. É sempre muito bom ter vocês por perto!!!

Às secretárias do departamento de Clínica: Eliane, Rosângela e Lourdes, por estarem sempre prontas a ajudar.

Aos funcionários da EV-UFGM, especialmente Adão, Palhinha, Liu e João, amigos de longa data, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meu Muito Obrigado!!!

"Mau será o dia do homem quando ele se tornar absolutamente satisfeito com a vida que está levando, quando não estiver mais eternamente batendo nas portas de sua alma um enorme desejo de fazer algo maior."

PHILLIPS BROOKS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Histórico.....	20
2.2	Etiologia.....	20
2.3	Patogenia.....	21
2.4	Latência.....	22
2.5	Epidemiologia.....	23
2.6	Sinais clínicos.....	26
2.7	Achados de necropsia e histopatológicos.....	26
2.8	Diagnóstico.....	28
2.9	Diagnóstico Diferencial.....	29
2.10	Controle e profilaxia.....	32
2.11	Utilização de coelhos como modelo experimental.....	33
2.12	Infecções herpéticas em coelhos.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Cultura de células e vírus.....	36
3.2	Titulação.....	36
3.3	Multiplicação Viral.....	37
3.3.1	Produção em larga escala	37
3.3.2	Purificação	37
3.4	Desenho experimental.....	37
3.4.1	Animais	38
3.4.2	Inoculação	39
3.4.3	Coleta de amostras	39

3.5	Processamento laboratorial das amostras.....	40
3.5.1	Hemograma	40
3.5.2	Soroneutralização	40
3.5.3	Titulação viral dos suabes nasais	41
3.5.4	Titulação viral dos tecidos	42
3.5.5	Histopatologia	43
3.5.6	Extração de DNA	43
3.5.7	Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	44
3.5.7.1	Condições das reações.....	44
3.5.7.2	Análise dos produtos de PCR.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Sinais clínicos.....	45
4.2	Hemograma.....	47
4.3	Soroconversão.....	51
4.4	Titulação viral dos suabes nasais.....	51
4.5	Titulação viral dos tecidos.....	56
4.6	Achados de necropsia e histopatológicos.....	59
4.7	Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	62
5	CONCLUSÕES	66
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Datas e procedimentos realizados com coelhos infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5.....	38
Figura 2	Efeito citopático observado na titulação viral em células MDBK a partir do “pool” de suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5.....	54

Figura 3	Efeito citopático observado na titulação viral em células MDBK a partir de diversos fragmentos de tecidos de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5.....	58
Figura 4	Cortes histológicos de sistema nervoso de coelhos experimentalmente infectados com a amostra Mutum de BoHV-5.....	60
Figura 5	PCR <i>semi-nested</i> de DNA extraído do sobrenadante dos macerados de tecidos e suabes nasais – 515pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio.....	63
Figura 6	PCR <i>nested</i> com amostra de DNA extraído do sobrenadante dos macerados de tecidos e suabes nasais - 222 pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio.....	63
Figura 7	PCR <i>semi-nested</i> de DNA extraído do sobrenadante dos suabes nasais - 515 pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio.....	64
Figura 8	PCR <i>nested</i> de DNA extraído do sobrenadante dos suabes nasais - 222 pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distúrbios neurológicos em bovinos.....	32
Tabela 2	Via de inoculação, dose infectante e dia da eutanásia dos coelhos infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	38
Tabela 3	Iniciadores, orientação, localização e tamanho esperado do amplicon.....	44
Tabela 4	Seqüência, orientação e localização do par de iniciadores complementares ao gene US4 do BoHV-5.....	44
Tabela 5	Sintomas dos coelhos do 5° dia, infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	46
Tabela 6	Sintomas dos coelhos do 12° dia, infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	46
Tabela 7	Valores médios do eritrograma e avaliação de plaquetas nos dias 0 e 5 pi, dos animais controle e infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	48

Tabela 8	Valores individuais do eritrograma e avaliação de plaquetas do animal controle 2 e dos animais do 12° dia, infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	48
Tabela 9	Valores médios do leucograma nos dias 0 e 5 pi, dos animais controle e infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	50
Tabela 10	Valores individuais do leucograma do animal controle 2 e dos animais do 12° dia, infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	50
Tabela 11	Soroconversão para a amostra Colorado de BoHV-1 e amostra padrão EVI-88 de BoHV-5 em coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	51
Tabela 12	Titulação viral dos suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	52
Tabela 13	Efeito citopático provocado por agente desconhecido, observado em material proveniente de suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	52
Tabela 14	Titulação viral dos tecidos macerados provenientes de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.....	56
Tabela 15	Fragmentos de tecidos dos coelhos inoculados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, onde detectou-se o vírus utilizando-se dois sistemas de PCR, Belo Horizonte, 2008.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrômetros
ADI	Anemia da Doença Inflamatória
BO	Bulbo olfatório
BoHV	Herpesvirus bovino
BoHV-1	Herpesvirus bovino 1 (Bovine herpesvirus 1)
BoHV-1.1	Herpesvirus bovino 1 subtipo 1 (Respiratório)
BoHV-1.2	Herpesvirus bovino 1 subtipo 2 (Genital)
BoHV-1.3	Herpesvirus bovino 1 subtipo 3 (Neurológico)
BoHV-5	Herpesvirus bovino 5 (Bovine herpesvirus 5)
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
BVD	Diarréia Viral Bovina
C1	Animal controle 1
C2	Animal controle 2
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média.
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Gás carbônico
CpHV-1	Herpesvirus caprino 1 (Caprine herpesvirus 1)
CvHV-1	Herpesvirus cervideo 1 (Cervid herpesvirus 1)
CvHV-2	Herpesvirus cervideo 2 (Cervid herpesvirus 1)
dl	Decilitro
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
ECP	Efeito citopático
EDTA	Etileno diamino tetracetato

gE	Glicoproteína E
gG	Glicoproteína G
HCM	Hemoglobina corpuscular média
H&E	Hematoxilina-Eosina
HHV-1	Herpesvirus humano 1 (Human herpesvirus 1)
HSV-1	Herpes simplex virus 1
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IC	Intra-conjuntival
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICTV	Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPV	Vulvovaginite Infecciosa Pustular
kg	Kilogramas
l	Litro
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LeHV-1	Herpesvirus leporideo 1 (Leporid herpesvirus 1)
LeHV-2	Herpesvirus leporideo 2 (Leporid herpesvirus 2)
LeHV-3	Herpesvirus leporideo 3 (Leporid herpesvirus 3)
LR	Gene relacionado com a latência
M	Molar
MDBK	Células de rim de bovino
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MPE	Membro posterior esquerdo
ng	Nanogramas
NIPE	Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental
nm	Nanômetros

pb	Pares de base
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PEM	Polioencefalomalacia
pH	Potencial Hidrogeniônico
pi	Pós-inoculação
Pmol	Pico mol
RAPD	DNA polimorfico amplificado randomicamente
RDW	Varição de tamanho das hemácias
Rpm	Rotações por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tris-borato-EDTA
TCID ₅₀	Dose infectante para 50 % do cultivo tecidual
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCM	Volume Corpuscular Médio
V	Volts

RESUMO

Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus associado com meningoencefalite, uma doença geralmente fatal e altamente prevalente na América do Sul. Neste trabalho, coelhos foram infectados com a amostra brasileira Mutum de BoHV-5, isolada de um bovino que apresentou sintomas medulares, pouco comuns à enfermidade. Seis animais foram inoculados pela via intranasal e dois permaneceram como controle. Os coelhos foram monitorados clinicamente e submetidos a três coletas de sangue e quatro coletas de suabes nasais. Metade dos animais foi eutanasiada no dia 5 pi e os demais no dia 12 pi. Fragmentos de córtex cerebral, cerebelo, tronco encefálico, gânglio trigêmeo, medula cervical, medula torácica e medula lombar foram coletados em duplicata e encaminhados para exame histológico e virológico. Os animais do 12º dia manifestaram principalmente convulsões, períodos de agitação ou depressão e tremores, a partir do dia 6 pi, porém nenhum morreu em decorrência da doença, durante o período experimental. Alterações histológicas foram discretas e estavam presentes somente em um dos animais do 12º dia. O vírus foi re-isolado do córtex cerebral, cerebelo, gânglio trigeminal, medula cervical, medula torácica e medula lombar dos animais infectados e foi eliminado via secreção nasal consistentemente a partir do dia 5 até o dia 12 pi. Através de PCR detectou-se BoHV-5 no tronco encefálico, cerebelo, medula cervical e medula torácica dos animais infectados. Até o momento, desconhece-se a existência de trabalhos previamente realizados que tenham re-isolado e detectado vírus em fragmentos de medula cervical e torácica, em animais natural ou experimentalmente infectados com BoHV-5. Os resultados obtidos reafirmam a condição do coelho como modelo experimental adequado para infecção como BoHV-5 através da inoculação intranasal. A detecção do vírus na medula espinhal aponta para a necessidade da mesma ser incluída como material adequado para diagnóstico de meningoencefalite por BoHV-5.

Palavras-chave: Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5); meningoencefalite; coelhos; modelo experimental.

ABSTRACT

Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) is an alphaherpesvirus associated with meningoencephalitis, an usually fatal disease and highly prevalent in South America. In this study, we infected rabbits with a Brazilian BoHV-5 strain, named Mutum, isolated from a bovine with spinal cord symptoms, uncommon for this illness. Six animals were inoculated intranasally and two (control group) were mock infected. The rabbits were clinically monitored and submitted to blood sampling and nasal swabs. The half of the animals was euthanatized 5 days postinoculation (pi) and the remaining, in the day 12 pi. Sections of brain cortex, cerebellum, brain stem, trigeminal ganglia, cervical spinal cord, thoracic spinal cord and lumbar spinal cord were collected in two samples for virological and histological examinations. The animals of 12th day showed seizures, periods of depression or excitability and tremors crisis, started on the day 6 pi, but it was not able to cause the death in the rabbits during the experiment. Mild microscopic lesions were observed just in one of the rabbits from 12th day. Infectious virus was recovered from cortex, cerebellum, trigeminal ganglia, cervical, thoracic and lumbar spinal cord of infected animals and was spread by nasal discharge from day 5 until day 12 pi. Viral DNA was detected in the brain stem, cerebellum, cervical spinal cord and thoracic spinal cord of infected animals. To our knowledge, there are no researches that had isolated and detected virus in sections of cervical and thoracic spinal cord in experimentally or naturally infected animals with BoHV-5. These results confirm the rabbits as a suitable model to experimental infection with BoHV-5 by the intranasal route. The virus detection in the spinal cord point to the need of consider it like an appropriate material to diagnosis of BoHV-5 meningoencephalitis.

Key words: Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5); meningoencephalitis; rabbits; experimental model.

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios do sistema nervoso em bovinos abrangem um grupo de enfermidades muito importantes, tanto pelo perigo em potencial que representam para a saúde humana como zoonoses, quanto pelas expressivas perdas econômicas que ocasionam. Somente a raiva é responsável pela perda anual de 50 milhões de dólares em todo o mundo (King e Turner, 1993). Dados nacionais relativos aos prejuízos causados pelas enfermidades neurológicas em bovinos ainda são escassos, em parte pela sub-notificação de casos e dificuldades no diagnóstico, embora levantamentos feitos em algumas regiões do Brasil indiquem que estas perdas podem chegar a 11 milhões de reais por ano somente no Rio Grande do Sul (Sanches et al., 2000). Na região sul deste mesmo estado, já foi confirmada a presença de mais de vinte enfermidades neurológicas dos ruminantes, sugerindo que este problema provavelmente ocorra em todo o país (Riet-Correa et al., 1998).

As neuropatias ganharam destaque desde o aparecimento, em 1986, da encefalopatia espongiiforme bovina (BSE) (Wells et al., 1987), e esta importância passou a ser ainda mais salientada após a relação desta enfermidade com o aparecimento de uma nova variante da doença humana CJD (*Creutzfeldt-Jakob disease*) na Inglaterra (Will et al., 1996). A crescente preocupação com as implicações econômicas, políticas, sanitárias e de saúde pública da BSE, motivou as autoridades sanitárias internacionais a solicitar dos países exportadores de carne, evidências de que seus rebanhos estão livres da doença. Estes países devem ter um controle capaz de atestar que seu rebanho bovino é livre de BSE e que também são capazes de identificar as doenças que afetam o sistema nervoso dos bovinos (Lemos, 2005).

O Brasil é considerado como área de risco desprezível para BSE e para permanecer neste patamar, deve manter um sistema de vigilância epidemiológica em que a maioria dos ruminantes que morrerem com sinais neurológicos sejam submetidos a diagnóstico diferencial (Lemos, 2005). Isto equivale a dizer que o país deve estar capacitado para diagnosticar as outras doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) de bovinos, mesmo na ausência de casos de BSE (Sanches, et al., 2000).

Além dos pontos citados anteriormente, pode-se associar ainda dois aspectos importantes envolvendo as neuropatias: sua frequência e dificuldade de diagnóstico, esta última, ligada principalmente à variação de manifestação clínica de uma mesma doença, à semelhança sintomatológica existente entre algumas delas e, em vários casos, à falta de estrutura técnica dos laboratórios para diagnóstico.

Dentre as neuropatias que ocorrem em bovinos, uma ainda pouco conhecida, porém muito estudada nos últimos anos é a meningoencefalite causada por *Herpesvirus bovino 5* (BoHV-5). A doença tem sido observada na América do Sul e do Norte (Barenfus et al., 1963; Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989), assim como Austrália (Johnston et al., 1962), Hungria (Bartha et al., 1969) e Escócia (Watt et al., 1981). No Brasil, onde sua importância vem crescendo, já foram descritos surtos em alguns estados das regiões Centro-oeste (De Paula et al., 2005), Sudeste (Salvador et al., 1998; Gomes et al., 2002; Aquino Neto, 2005), Sul (Riet-Correa et al., 1989) e Norte do país (Riet-Correa et al., 2006). O desconhecimento da prevalência desta infecção decorre da dificuldade da realização do diagnóstico diferencial entre as enfermidades que afetam o SNC dos bovinos. Estas enfermidades são comumente diagnosticadas somente por avaliação clínica, mas a semelhança na

sintomatologia neurológica dificulta a interpretação dos achados e induz diagnósticos equivocados.

No ano de 2004 o Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), recebeu uma vaca de cinco anos de idade, proveniente do município de Mutum (MG), apresentando quadro de neuropatia. O curso da doença foi de seis dias e os sinais clínicos apresentados por este animal eram de uma síndrome medular baixa, caracterizada por excitação, constante troca de apoio entre os membros posteriores e progressiva dificuldade para levantar-se e locomover-se. Por meio da imunofluorescência e inoculação em camundongos, descartou-se a possibilidade de raiva. Baseando-se nos achados histológicos, no teste da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento do amplicon amplificado, foi possível chegar ao diagnóstico de meningoencefalite por BoHV-5. A amostra de BoHV-5 do referido caso foi nomeada como Mutum e o segmento parcial da glicoproteína G do vírus foi sequenciado e depositado no *GenBank*, com número de acesso AY916517.

Os sintomas apresentados por este animal foram em parte distintos dos frequentemente descritos em outros casos de meningoencefalite por BoHV-5, pois iniciou-se com sinais medulares, que evoluíram dentro de cinco dias para uma síndrome cerebral. Os sinais clínicos descritos por outros autores consistem principalmente em um quadro cerebral, com depressão, tremores, convulsões, nistagmo, bruxismo e movimentos de pedalagem (Hill et al., 1984; Riet-Correa et al., 1996; Salvador et al., 1998; Sanches et al., 2000; Halfen e Vidor, 2001; Rissi et al., 2006). Acredita-se que o principal acesso do vírus ao SNC seja pelas fibras nervosas distribuídas na mucosa nasal (Mckercher et al., 1970), principalmente via bulbo olfatório e nervo trigêmeo (Beltrão et al.,

2000; Meyer et al., 2001; Caron et al., 2002).

O isolamento da amostra Mutum de um bovino com sintomatologia incomum para infecções naturais por BoHV-5, nos fez refletir sobre a probabilidade de que o vírus pudesse de alguma maneira atingir a medula espinhal. Uma das questões levantadas seria que estes sintomas possam ocorrer naturalmente, porém são de difícil observação porque muitas vezes os animais são encontrados em fase terminal. A assistência veterinária é solicitada geralmente neste momento, e a doença manifesta-se de forma esporádica, dificultando o acompanhamento clínico de vários casos simultaneamente. Outra hipótese seria a de que o isolado Mutum especificamente, tivesse uma maior facilidade de atingir a medula. Estes fatos foram os motivadores para a realização deste trabalho, considerando-se que a patogenia dos BoHV-5 ainda não está completamente esclarecida.

A utilização de coelhos como modelo experimental para infecção por BoHV-5, utilizando-se a via intranasal para inoculação, está bem definida. A utilização desta espécie em detrimento à bovina, justifica-se principalmente pelos custos reduzidos e facilidade de manejo. Os trabalhos demonstram altas taxas de morbidade e mortalidade, além da recuperação do vírus de amostras do SNC dos coelhos infectados (Meyer et al., 1996; Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o quadro clínico, as alterações histológicas e a localização do vírus no SNC com o re-isolamento viral, em coelhos inoculados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, para o entendimento da síndrome medular baixa observada no caso índice.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O *Herpesvirus bovine 5* foi isolado pela primeira vez na Austrália em 1962, de um surto de meningoencefalite, em bezerros de dois a seis meses de idade com 50% de mortalidade, embora naquela ocasião o vírus não tenha sido identificado como tal (Johnston et al., 1962). Estudos posteriores em cultivos celulares e isolamento viral permitiram a caracterização do isolado australiano que foi denominado N569 e logo associado com o *Herpesvirus bovine 1* (BoHV-1), causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Vulvovaginite Infecciosa Pustular (IPV). Reações sorológicas cruzadas entre os dois vírus foram detectadas com o soro de cobaias imunizados, além da presença de inclusões intranucleares morfológicamente idênticas às do vírus da IBR em cultivos celulares (French, 1962b). Após estas observações, vários surtos semelhantes de meningoencefalite foram descritos em diversas regiões do mundo (Barenfus et al., 1963; Gardiner et al., 1964; Bartha et al., 1969; Reed et al., 1973; Carillo et al., 1983a; Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989). De maneira geral, todos estes surtos foram associados ao BoHV-1 pelas características biológicas e antigênicas do agente. Logo começaram a ser formuladas algumas hipóteses sobre a patogenia da infecção e sugeriu-se a existência de amostras neurotrópicas de BoHV-1, com rápida replicação e com habilidade para causar quadro neurológico, diferentemente do que ocorria na IBR ou IPV (Hall et al., 1966; McKercher et al., 1970). Estas hipóteses foram reforçadas após a identificação de diferenças sorológicas entre a amostra N569 e isolados de IBR (Bagust, 1972).

Até a década de 1980, a meningoencefalite foi considerada uma manifestação clínico-

patológica da IBR e o vírus era classificado como um subtipo de BoHV-1 (George, 1991). Entretanto, comparações entre amostras neurovirulentas e não neurovirulentas de BoHV-1 revelaram diferenças significativas no perfil por restrição enzimática do DNA viral (Metzler et al., 1986; Engels et al., 1986; Studdert, 1989), na antigenicidade e no perfil eletroforético de proteína virais em Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Metzler et al., 1986).

Com base nas diferenças descritas acima, o BoHV-1 foi classificado em três subtipos: subtipo 1 (BoHV-1.1), relacionado a infecções no trato respiratório; subtipo 2 (BoHV-1.2), relacionado a infecções no trato reprodutivo e subtipo 3 (BoHV-1.3), relacionado a infecções neurológicas (Metzler et al., 1985; Engels et al., 1987). Apesar desta relativa relação entre os subtipos e locais de infecção, os mesmos podem circular por todo o organismo animal, causando também aborto, conjuntivite, vulvovaginite e infecção sistêmica em neonatos (Fenner, 1993).

Esta classificação foi aceita e confirmada por diversos autores, e somente em 1992 o *The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) propôs uma reclassificação, em que as amostras neurotrópicas da encefalite bovina passaram a constituir uma espécie viral distinta, denominada de *Herpesvirus bovine 5* (Roizman et al., 1992).

2.2 Etiologia

O BoHV-5 pertence à família *Herpesviridae*, cuja inclusão de membros é baseada na arquitetura do virion. Todos os herpesvírus possuem um cerne contendo DNA linear de fita dupla, tamanho de virion assemelhado (200 a 250nm) e

estrutura similar, composta por capsídeo, tegumento e envelope. A maioria dos herpesvírus pode ser subdividida em três principais subfamílias com base nas suas propriedades biológicas, conteúdo genômico e organização: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*. Estas subfamílias diferem no tipo de células onde a latência é estabelecida e na duração do seu ciclo de replicação produtiva (Roizman e Pellett, 2001; ICTV, 2007).

Os alfaherpesvirus caracterizam-se por possuírem ampla variedade de hospedeiros, ciclo de replicação curto com rápida disseminação em cultivo celular, destruição das células hospedeiras durante a multiplicação viral, além da capacidade de estabelecer infecção latente primariamente, mas não exclusivamente dentro dos gânglios sensoriais. Os betaherpesvirus têm a mais restrita quantidade de hospedeiros e a mais lenta taxa de replicação, que frequentemente é acompanhada por aumento do tamanho celular (citomegalia) e estabelecimento de latência em glândula secretórias, rins e células linfocitárias. Já os gama herpesvirus, infectam células linfoblastóides e geralmente são específicos para linfócitos T ou B, estabelecendo latência no tecido linfóide. Todos os herpesvírus são hábeis em permanecer latentes nos hospedeiros naturais, em células específicas que variam de vírus para vírus (Pomeranz et al., 2005; ICTV, 2007).

Na subfamília *Alphaherpesvirinae*, além do BoHV-5, estão também alocados outros herpesvírus que acometem ruminantes como o *Herpesvirus bovinum 1* (BoHV-1), o *Herpesvirus caprinum 1* (CpHV-1), o *Herpesvirus cervicium 1* e 2 (CvHV-1 e CvHV-2) e o Vírus da Doença de Aujeszky, uma vez que os ruminantes são hospedeiros secundários desse vírus (ICTV, 2007).

2.3 Patogenia

São três as características básicas da infecção pelos herpesvírus: epiteliotropismo, lise celular e capacidade de latência. As principais portas de entrada do vírus são as superfícies mucosas do trato respiratório e genital. A transmissão é geralmente associada ao contato íntimo com essas superfícies, mas BoHV-5 é também propagado por aerossóis e secreções corpóreas (Fenner et al., 1993). Recentemente foi comprovado que o vírus é eliminado via sêmen, em animais assintomáticos (Gomes et al., 2003; Esteves et al., 2003; Silva et al., 2007b).

Após inoculação intranasal, os alvos iniciais de replicação dos *Alphaherpesvirus* são as células superficiais da mucosa respiratória. Após replicação na mucosa nasofaríngea, os vírions invadem as terminações nervosas e são transportados através do fluxo axônico retrógrado aos corpos neuronais de neurônios sensoriais e autonômicos. O vírus é provavelmente transportado na forma de partícula subviral (capsídeo desprovido de envelope) em vesículas envolvidas com o transporte axônico. Nos corpos neuronais, o vírus pode replicar ativamente ou estabelecer infecção latente. Ácidos nucleicos e proteínas virais são facilmente demonstráveis nos gânglios sensoriais, e exames ultraestruturais revelam replicação viral ativa. Replicação significativa no sistema nervoso periférico após a infecção aguda ou reativação da latência pode resultar em invasão do sistema nervoso central, provocando alterações que variam desde infecção subclínica até encefalite fatal (Flores et al., 1998).

O acesso ao SNC pode ocorrer através de diversos grupos de neurônios que inervam a cavidade nasal: 1. neurônios bipolares do sistema olfatório, que projetam-se ao bulbo

olfatório; 2. neurônios sensoriais pseudounipolares, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio trigêmeo; 3. neurônios do sistema nervoso simpático, cujos corpos neuronais situam-se no gânglio pterigopalatino e 4. neurônios do sistema nervoso simpático cujos corpos celulares estão situados no gânglio cervical superior. O caminho mais consistente de invasão do SNC pelo BoHV-5 parece ser através de fibras sensoriais dos ramos mandibular e maxilar do nervo trigêmeo (Fenner et al., 1993).

Ao final da fase de infecção aguda ganglionar, o vírus persiste dentro dos neurônios provavelmente por toda a vida do hospedeiro, sob a forma de uma molécula circular fechada, onde somente uma pequena porção do gene viral é expressa (Flores et al., 1998).

2.4 Latência

Todos os herpesvírus são capazes de estabelecer infecção latente, a qual caracteriza-se pela ausência de vírus infeccioso e de antígenos virais (Engels e Ackermann, 1996). Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem como característica principal o estabelecimento de latência nos nervos sensoriais, embora possa ocorrer também nos gânglios sensoriais, linfonodos e mucosa nasal. Sabe-se que o vírus latente permanece localizado próximo ao sítio de replicação primária e que será reexcretado também, no local de infecção primária (Pastoret et al., 1982 citado por Gomes, 2001; Engels e Ackermann, 1996).

A latência é caracterizada pela impossibilidade de se detectar o vírus infeccioso no hospedeiro, bem como antígeno viral nas células do mesmo. Entretanto, o DNA viral pode ser demonstrado mesmo nestas infecções, através de experimentos de hibridizações *in situ* ou PCR (Engels e Ackermann, 1996).

Os eventos moleculares que controlam o estágio de latência ainda não estão completamente esclarecidos. Sabe-se, no entanto, que pelo menos duas condições devem ser seguidas para levar ao estabelecimento de uma latência biologicamente significativa. Inicialmente, células de longa vida, não replicativas e altamente diferenciadas como neurônios ou células linfóides são ideais para latência viral. Além disso, em contraste à infecção lítica que leva a uma infecção produtiva e replicação nos tecidos periféricos, a célula infectada de forma latente não deve jamais ser destruída. Sendo assim, tanto a indução da apoptose, quanto a destruição por mecanismos imunológicos devem ser impedidas (Engels e Ackermann, 1996).

Em contraste com a infecção lítica, somente uma pequena região do genoma denominada de gene relacionado com a latência (LR – *latency related*), é transcrita ativamente em neurônios com infecção latente por BoHV-1 (Kutish e Rock, 1990). Mutantes deste vírus com deleção no gene LR são capazes de estabelecer latência *in vivo*, embora apresentem uma reativação retardada e ineficiente (Rock, 1994). Os LR são capazes de reduzir a apoptose em infecções em cultura de tecidos e durante a mudança da infecção aguda para a latente no gânglio trigeminal de coelhos (Mott et al., 2003), condição primordial para a caracterização do estado de latência.

A reativação de latência é responsável pela perpetuação e transmissão do vírus na natureza. Vários são os fatores associados com esta reativação, como o estresse, o transporte do animal, o tratamento com glicocorticóides e o parto. Novas partículas víricas são sintetizadas no sítio de latência e reexcretadas. A replicação viral proveniente da reativação pode causar recorrência da doença, com manifestação dos sinais clínicos, muitas vezes mais graves que na infecção aguda. Alterações histopatológicas no sistema nervoso central e periférico, à

semelhança de alterações que ocorrem durante a infecção aguda, podem ser observadas. A reativação de herpesvírus que acometem ruminantes geralmente produz uma infecção subclínica (Engels e Ackermann, 1996).

O sistema imune pode atuar impedindo a reativação viral. Entretanto, dependendo do período entre a infecção inicial e a reativação, a resposta imune local pode não estar estimulada o suficiente para prevenir a reativação produtiva (Engels e Ackermann, 1996).

Os fatores relacionados à reativação do vírus latente estimulam de alguma forma, proteínas ativadoras celulares ou virais que induzem a expressão gênica e replicação viral. Entre as proteínas “imediatamente precoces” estão as regulatórias, que ativam a expressão gênica viral. Assim, sua indução é suficiente para iniciar a reativação do herpesvírus latente. O metabolismo celular pode não estar ativo para permitir a replicação viral, mas as enzimas virais relacionadas com a síntese de DNA podem suprir essa deficiência (Engels e Ackermann, 1996).

De maneira resumida, os eventos de latência e reativação virais são divididos em três etapas: estabelecimento, manutenção e reativação. O estabelecimento da latência inclui a entrada do genoma viral em um neurônio sensorial e estabelecimento de infecção aguda. A expressão gênica viral é então interrompida. A manutenção da latência é a fase caracterizada pela ausência de detecção viral por procedimentos padrão de isolamento viral. Finalmente, a reativação é iniciada por um estímulo externo que leva à expressão gênica do vírus (Jones, 2003).

Vogel et al. (2003) demonstraram que DNA de BoHV-5 está presente em várias áreas do cérebro durante a infecção latente e que a reativação do vírus pode resultar no

estabelecimento de infecção em outras áreas do SNC além das que já estavam durante a infecção primária. Embora a reativação de latência de alfa herpesvírus em animais tenha sido largamente aceita como sendo predominantemente subclínica, vários autores demonstraram que tanto sob condições naturais quanto após indução por dexametasona, a reativação de BoHV-5 é frequentemente acompanhada por doença neurológica em bovinos e coelhos (Beltrão et al., 2000; Caron et al., 2002; Perez et al., 2002; Vogel et al., 2003). O DNA viral presente em áreas profundas do cérebro durante a infecção latente, associado à reativação do vírus a partir do gânglio trigêmeo, pode servir como fonte de vírus para infecção neurológica durante a reativação (Vogel et al., 2003).

2.5 Epidemiologia

Surtos de meningoencefalite por BoHV-5 foram descritos em várias regiões do mundo, tais como na Austrália (Johnston et al., 1962; French, 1962a; Gardner et al., 1964; Hill et al., 1984), Estados Unidos (Barenfus et al., 1963; Reed et al., 1973; Eugster et al., 1977; D’Offay et al., 1993), Argentina (Carrillo et al., 1983a; Carrillo et al., 1983b; Pérez et al., 2003), Brasil (Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989; Botelho, 2000; Gomes et al., 2002; Aquino Neto, 2005) e esporadicamente em outros países como na Itália (Moretti et al., 1964), Hungria (Bartha et al., 1969), Síria (Bagdadi e Martin, 1974 citado por Riet-Correa et al., 1989), Canadá (Beck, 1975; Gough e James, 1975), Escócia (Watt et al., 1981) e Uruguai (Dias et al., 1982 citado por Rissi et al., 2006).

A enfermidade afeta principalmente bovinos jovens, submetidos a situações de estresse (Johnston et al., 1962; Gardner et al., 1964; Reed et al., 1973; Gough e James, 1975; Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989; Salvador et al., 1998; Colodel et

al., 2002; Elias et al., 2004; Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006), embora possa também afetar animais adultos (Beck, 1975; Vasconcelos et al., 1993; Salvador et al., 1998; Aquino Neto, 2005). A doença ocorre na forma de surtos ou de casos isolados (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; De Paula et al., 2005; Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006). Casos raros de meningoencefalite por BoHV-1 com sintomatologia idêntica aos causados por BoHV-5 também tem sido relatados (Furuoka et al., 1995; Roels et al., 2000; Penny et al., 2002).

A infecção natural por BoHV-5 foi descrita somente em bovinos, mas a doença já foi reproduzida em ovinos (Belák et al., 1999; Silva et al., 1999b) e coelhos (Beltrão et al., 2000; Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002; Diel et al., 2005). Anticorpos contra BoHV-5 já foram detectados em ovinos (Lindner et al., 1993), indicando que esta espécie pode ser naturalmente infectada (Rissi et al., 2007). Caprinos infectados experimentalmente desenvolveram a infecção aguda e latente, excretaram o vírus após infecção induzida por dexametazona, mas aparentemente são mais resistentes que os bovinos e não desenvolveram a doença neurológica (Diel et al., 2007). A meningoencefalite por BoHV-5 é geralmente esporádica e fatal, ao contrário da enfermidade causada pelo BoHV-1, que é endêmica e apresenta baixas taxas de mortalidade (Silva et al., 1998).

No Brasil, a descrição de meningoencefalite não supurativa associada aos herpesvírus foi feita pela primeira vez em 1989 no Rio Grande do Sul, afetando bezerros com até um mês de idade (Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989) e durante quase dez anos foi diagnosticada somente neste estado. Na ocasião o vírus foi considerado BoHV-1, pois não haviam condições apropriadas para a tipificação dos isolados. Posteriormente, Vasconcelos et al. (1993) relataram um caso esporádico de

meningoencefalite por BoHV, só que desta vez acometendo uma vaca de dois anos e meio de idade. O diagnóstico baseou-se na avaliação clínica, na histopatologia e microscopia eletrônica do isolado viral. Novo surto voltou a ser descrito afetando novilhos de um ano e meio que tinham sido transportados 30 dias antes, de Santa Vitória do Palmar (RS) para Capão do Leão (RS) (Schild et al., 1994 citado por Quincozes et al., 2005) e no ano seguinte na primeira cidade, outros casos foram diagnosticados, desta vez em bezerros entre sete e oito meses, recém desmamados (Riet-Correa e Schild, 1995 citado por Quincozes et al., 2005). Weiblen et al. (1996) também isolaram BoHV-5 de um surto envolvendo oito animais de dois meses de idade, no município de São Martinho da Serra (RS), em 1993.

A partir do ano de 1998 foram descritos surtos da enfermidade em outros estados e regiões do país, afetando animais de todas as idades, dentre eles no Mato Grosso do Sul (Salvador et al., 1998; Lemos, 2005), Paraná (Gomes, 2001), Rio de Janeiro (Gomes, 2001), Mato Grosso (Colodel et al., 2002), São Paulo (Lemos, 2005), Rondônia (Lemos, 2005), Goiás (De Paula et al., 2005) e Pará (Riet-Correa et al., 2006). Botelho (2000) realizou um estudo retrospectivo de 20 anos (1978 – 1998) em 17 amostras de SNC parafinado, pertencentes ao acervo do Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, oriundas de animais que manifestaram sintomatologia neurológica, porém que não tiveram seu diagnóstico estabelecido. O BoHV-5 foi isolado em cinco das 17 amostras. Quatro destas amostras eram provenientes de Minas Gerais e uma do Espírito Santo. Gomes et al (2002), isolaram BoHV-5 em duas amostras de SNC parafinado provenientes de surtos de neuropatia no estado de São Paulo e em três amostras congeladas, oriundas do Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA, de animais que

morreram com sintomatologia nervosa e que tinham suspeita clínica primária de raiva.

No estado de Minas Gerais foi relatado um caso de meningoencefalite por BoHV-5 em um bovino adulto, que manifestou sintomas de síndrome medular baixa com evolução para síndrome cortical. Este animal era proveniente de uma propriedade leiteira no município de Mutum (MG), onde poucos meses antes haviam morrido quatro vacas manifestando sintomatologia semelhante, com meningoencefalite não supurativa, negativas para raiva e que permaneceram com diagnóstico inconclusivo. A amostra de BoHV-5 isolada deste caso clínico foi denominada de Mutum. Destacam-se os sintomas descritos e a ocorrência da enfermidade em animal adulto. Esta apresentação clínica difere das demais descrições da enfermidade no Brasil (Aquino Neto, 2005).

Fatores epidemiológicos que favorecem a disseminação viral nos rebanhos incluem a grande concentração de animais, introdução de bovinos de outros locais e desmame de lotes de bezerros em idade que coincide com o decréscimo da imunidade passiva (George, 1991). Algumas condições, naturais ou induzidas (administração de dexametasona) podem reativar o vírus do estado latente e propiciar condições para a sua disseminação e transmissão a outros indivíduos susceptíveis (Belknap et al., 1994). Nos surtos de meningoencefalite por BoHV-5 ocorridos no Brasil, foram descritas situações semelhantes envolvidas com o desenvolvimento da enfermidade, como vacinação, desmame, mudança de alimentação, castração, troca de piquetes (Elias et al., 2004) e introdução de bovinos no rebanho (Colodel et al., 2002). O desmame recente de bezerros foi descrito em 75% das propriedades onde ocorreram casos da doença, porém em nenhuma ocasião foi observada relação com uma possível falha na transferência passiva de

imunidade (Rissi et al., 2006). Estudos experimentais (Belknap et al., 1994) comprovaram a ação da imunidade passiva ao demonstrarem que grupos de bezerros privados de colostro desenvolveram encefalite e doença respiratória após inoculação com BoHV-5 e BoHV-1, respectivamente, enquanto que os que receberam colostro não apresentaram qualquer sinal nervoso na infecção primária. Entretanto, quando administrou-se dexametasona para estes animais, no dia 60 pós-inoculação, os mesmos apresentaram sinais respiratórios discretos, letargia, aumento da temperatura retal, e excretaram partículas virais nas secreções nasais, demonstrando reativação viral de modo semelhante ao que pode ocorrer em situações naturais de estresse.

A relação epidemiológica entre casos de meningoencefalite por BoHV-5 e polioencefalomalacia (PEM) é descrita no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002) e, evidências experimentais sugerem que fatores etiológicos da PEM possam reativar infecções latentes por BoHV-5 em bovinos (David, et al., 2007). Além disso, são descritos casos experimentais de infecção por BoHV-5 em que infecção acidental pelo vírus da diarreia viral bovina (BVD) pode ter exacerbado os sinais clínicos da infecção por BoHV-5 e aumentado a quantidade de vírus excretado pela via nasal (Spilki et al., 2006). Estes autores sugerem que ambas as doenças (PEM e BVD) possam ter relação com casos de meningoencefalite em condições naturais. Spilki et al. (2003) relataram um caso de infecção simultânea de um bezerro com o vírus rábico e BoHV-5. Não foi esclarecido o papel do BoHV-5 no desencadeamento da sintomatologia clínica neste animal, porém uma das hipóteses dos autores é a de que o herpesvírus poderia estar em estado de latência e tenha sido reativado pelo vírus da raiva.

A prevalência e a distribuição geográfica da infecção por BoHV-5 são pouco conhecidas, o que se deve em parte por sua estreita reação sorológica cruzada com BoHV-1 (D'offay et al., 1995) e pela incapacidade até o momento da maioria das técnicas sorológicas em diferenciar com segurança os dois vírus (Teixeira et al., 2001). Por razões ainda não determinadas, os casos clínicos resultantes da infecção pelo BHV-5 parecem apresentar distribuição geográfica restrita, sendo diagnosticados com maior frequência no hemisfério sul que no hemisfério norte (D'arce et al., 2002), principalmente no Brasil e na Argentina (Perez et al., 2002).

2.6 Sinais clínicos

A evolução do quadro clínico nos bovinos afetados por meningoencefalite por BoHV-5 varia de 1 a 15 dias (Johnston et al., 1962; Beck, 1975; Carrillo et al., 1983a; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; De Paula et al., 2005; Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006) e se inicia após período de incubação de 7 a 10 dias (Gardner et al., 1964; Reed et al., 1973; Belknap et al., 1994). Na maioria dos casos a doença é fatal, embora existam relatos de surtos em que houve recuperação de animais após o quadro clínico (Johnston et al., 1962; Gardner et al., 1964; Elias et al., 2004; Rissi et al., 2006). Os sinais clínicos caracterizam-se por desidratação, emagrecimento, febre, corrimento nasal e ocular, e sinais nervosos como depressão profunda, nistagmo, opistótono, tremores musculares mais evidentes na cabeça e pescoço, hiperestesia ao tato ou ao som, perda dos reflexos sensoriais, especialmente o visual, também podendo ocorrer uma diminuição nos reflexos auditivos e cutâneos, marcha para trás ou em círculos, incoordenação, pressão da cabeça contra objetos, convulsões e quedas. Sinais clínicos inespecíficos, tais como dor abdominal, taquicardia, taquipnéia, anorexia, pêlos arrepiados e melena,

também são descritos em casos da doença (Johnston et al., 1962; Gardner et al., 1964; Reed et al., 1973; Kahrs, 1977; Vasconcelos et al., 1993; Salvador et al., 1998; Silva et al., 1999b; Elias et al., 2004; Diel et al., 2007; Rissi et al., 2006). Em alguns casos ocorre ainda incapacidade para ingestão de água ou apreensão de alimentos, bruxismo, paralisia de língua e decúbito com movimentos de pedalagem. A depressão profunda pode ser o único sinal clínico evidente nos primeiros dois ou três dias da enfermidade (Hill et al., 1984; Riet-Correa et al., 1996; Salvador et al., 1998; Sanches et al., 2000; Halfen e Vidor, 2001; Rissi et al., 2006).

Há relato de um caso da doença, onde o animal apresentava inicialmente uma marcante excitação, com reação exacerbada ao som e ao toque e postura em estação com membros posteriores aduzidos, levemente deslocados para frente e com freqüente troca de apoio entre os mesmos. Esta alteração foi observada logo no primeiro dia de evolução da doença e foi gradativamente agravando-se, até a perda da capacidade locomotora, no quarto dia após o início dos sinais clínicos. Mesmo em decúbito esternal o animal ainda ingeria água e alimentos, e permaneceu com psiquismo normal até o sexto dia, quando apresentou-se em decúbito lateral, perdeu sensibilidade e veio a óbito (Aquino Neto, 2005).

2.7 Achados de necropsia e histopatológicos

Na maioria das vezes não são evidenciadas alterações significativas à necropsia dos animais que morreram em decorrência da meningoencefalite por BoHV-5 (Salvador et al., 1998; Riet-Correa et al., 2006). No encéfalo, os bovinos podem não apresentar lesões macroscópicas (Johnston et al., 1962; Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006), embora com frequência sejam observados

vários graus de lesões inflamatórias e degenerativas (Johnston et al., 1962; Gardiner et al., 1964; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; De Paula et al., 2005; Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006). As lesões geralmente são assimétricas, podem ter ampla variação entre os bovinos (Belknap et al., 1994; Perez et al., 2002) e são mais intensas nas porções rostrais do encéfalo (Johnston et al., 1962; Gardiner et al., 1964; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Rissi et al., 2006).

As principais alterações macroscópicas descritas são hiperemia difusa dos vasos das leptomeninges por toda a extensão do encéfalo (Gardiner et al., 1964; Carrillo et al., 1983a; Rissi et al., 2006), edema (Dias et al., 1982 citado por Rissi et al., 2007), focos de hemorragia na superfície de corte do encéfalo (Elias et al., 2004; Colodel et al., 2002), além de tumefação das porções rostrais do telencéfalo com achatamento e amarelamento das circunvoluções dos lobos frontais, características de malacia (Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989; Salvador et al., 1998; Rissi et al., 2006). Áreas de malacia também podem ser observadas nos lobos parietais do córtex telencefálico, no tálamo e nos núcleos da base (Rissi et al., 2006). Outros achados incluem muco nas fossas nasais, hiperemia da mucosa nasal (Dias et al., 1982 citado por Rissi et al., 2007; Carrillo et al., 1983a), aumento de volume, edema e hemorragia focal nos linfonodos pré-escapulares, retrofaríngeos e submandibulares (Perez et al., 2002), além de focos hemorrágicos na mucosa da laringe e faringe (Carrillo et al., 1983a).

O achado histopatológico mais comum é uma meningoencefalite não supurativa, algumas vezes acompanhada de malacia, normalmente difusa, mas que varia quanto à localização e intensidade em cada caso (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Pedraza et al., 2004;

Rissi, et al., 2006). A intensidade das lesões é mais acentuada em ordem decrescente, na região cortical dos lobos frontais do telencéfalo, na cápsula interna e núcleos da base, no tálamo, no tronco encefálico, no córtex parietal, córtex occipital e cerebelo (Rissi, et al., 2006).

A lesão é caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear nas meninges e espaço perivascular, associado à vasculite, necrose neuronal, edema perineuronal e da substância branca, gliose multifocal (Ely et al., 1996; Salvador et al., 1998; Sanches et al., 2000; Meyer et al., 2001; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Pedraza et al., 2004; Rissi, et al., 2006), além de inclusões intranucleares eosinofílicas em astrócitos e neurônios que podem aparecer em maior ou menor frequência (George, 1991; Ely et al., 1996; Salvador et al., 1998; Elias et al., 2004; Rissi, et al., 2006), ou ocasionalmente não serem encontradas (Barenfus et al., 1963; Carrillo et al., 1983b). Estas inclusões são mais frequentemente encontradas em áreas de inflamação e malacia (Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Rissi, et al., 2006). Na quase totalidade dos relatos de casos naturais da enfermidade, não são citados achados histopatológicos no gânglio do nervo trigêmeo (Johnston et al., 1962; Barenfus et al., 1963; Gardner et al., 1964; Carrillo et al., 1983b; Riet-Correa et al., 1989; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Riet-Correa et al., 2006; Rissi, et al., 2006), embora na infecção experimental de bovinos com BoHV-5 tenha sido descrita a ocorrência de discreta ganglioneurite envolvendo o gânglio do nervo trigêmeo e o próprio nervo trigêmeo (Meyer et al., 2001; Perez et al., 2002).

Na grande maioria dos casos de meningoencefalite por BoHV-5, as lesões histológicas são basicamente as mesmas (Johnston et al., 1962; Carrillo et al., 1983b; Riet-Correa et al., 1989; Salvador et al.,

1998; Meyer et al., 2001; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Riet-Correa et al., 2006; Rissi, et al., 2006) , porém diferem em relação à presença ou não de malacia nos diversos surtos descritos (Hill et al., 1984; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006). Este fato pode estar atribuído às diferenças de neurovirulência entre amostras de BoHV-5 (Beltrão et al., 2000; Caron et al., 2002) ou nos critérios empregados pelos diferentes autores para classificar malacia (Rissi et al., 2006).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico de meningoencefalite por BoHV-5 deve basear-se em um primeiro momento nos dados epidemiológicos, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatológicos característicos (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Riet-Correa et al., 2006). A confirmação do mesmo deverá ser realizada através da identificação de antígenos virais em secreções ou tecidos de animais infectados, do isolamento do vírus em cultivos celulares ou, ainda, por métodos moleculares de diagnóstico (d'Offay et al., 1995; Roehe et al., 1997; Souza et al., 2002; Kunrath et al., 2004). Rissi et al. (2007) propõem que as alterações histopatológicas no SNC, mesmo sem a presença de inclusões, são características o suficiente e permitem um diagnóstico de rotina em casos onde os exames virológicos não sejam possíveis.

Em decorrência da grande relação antigênica, genética e biológica entre o BoHV-1 e o BoHV-5, a maioria dos testes laboratoriais disponíveis, dentre eles a soroneutralização, não é capaz de distingui-los (Roehe et al., 1998). Da mesma forma, em cultivos celulares não existem diferenças morfológicas entre os isolados de BoHV-5 e BoHV-1 em relação ao efeito citopático (ECP) visualizado nas células infectadas pelos herpesvírus (Seal et

al., 1994). Normalmente, após o isolamento viral, o agente envolvido é confirmado por testes de neutralização viral frente a um soro anti-BoHV-5 ou BoHV-1, ou quando possível, por testes de imunofluorescência ou imunoperoxidase com anticorpos específicos, policlonais ou monoclonais (Roehe et al., 1997; Almeida et al., 1998; Salvador et al., 1998; Kunrath et al., 2004).

A imunoistoquímica é um método adequado para a identificação do BoHV-5 em amostras fixadas em formol (Hübner et al., 2005; De Paula et al., 2005). A marcação por imunoperoxidase por anticorpo primário anti-BoHV-5 foi demonstrada em neurônios, células da glia e macrófagos em tecidos provenientes de casos naturais da doença (d'Offay et al., 1995).

A restrição enzimática do genoma ou a PCR também podem ser utilizadas para detecção e diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 de amostras isoladas em laboratório ou provenientes de casos clínicos (Ashbaugh et al., 1997; Alegre et al., 2001; D'Arce et al., 2002; Claus et al., 2005). Esta última técnica vem-se tornando a escolha para o desenvolvimento de um teste eficiente, principalmente devido a sua especificidade, sensibilidade e rapidez de execução (Ashbaugh et al., 1997). Ensaios de fragmentos de DNA amplificados randomicamente (RAPD) para diferenciação entre amostras dos dois tipos de vírus, também foram desenvolvidas (Afonso et al., 2007).

Para que as técnicas laboratoriais sejam bem sucedidas, é muito importante a coleta e conservação, sob refrigeração, do material a ser enviado ao laboratório, sendo esta a única forma de confirmação do diagnóstico, visto que não existem sinais clínicos patognômicos da doença (Fenner, 1993).

Vogel et al. (2003) identificaram DNA viral de BoHV-5 em várias áreas no SNC de

bezerros latentemente infectados e afirmam que este achado pode ter importantes implicações para o diagnóstico da enfermidade. Em regiões onde a infecção por BoHV-5 é enzoótica, o uso de PCR específica para BoHV-5 para diagnóstico de doença neurológica em bovinos deve ser cuidadosamente considerada, uma vez que animais latentemente infectados com este vírus e acometidos por outra enfermidade neurológica podem ser erroneamente diagnosticados como casos de infecção aguda por BoHV-5. Deste modo, a detecção do DNA de BoHV-5 em tecidos nervosos de bovinos com sinais neurológicos e sem concomitante isolamento viral e/ou detecção de antígenos virais não necessariamente indica infecção aguda por BoHV-5.

2.9 Diagnóstico Diferencial

Os sinais neurológicos presentes nas infecções pelo BoHV-5 podem ser observados em diversas situações onde haja comprometimento das funções do SNC. Deste modo, é fundamental o diagnóstico diferencial (Claus et al., 2002). O estabelecimento do diagnóstico diferencial das neuropatias bovinas no Brasil geralmente encontra uma série de dificuldades, principalmente em decorrência da grande semelhança entre os sintomas manifestados, atendimento clínico com os animais já em estado terminal, pequena quantidade de laboratórios em relação à extensão territorial do país e desconhecimento, por muitos, de adequadas técnicas de coleta e remessa de material para diagnóstico laboratorial (Aquino Neto, 2005).

Uma anamnese bem conduzida fornecerá informações que podem, em parte, direcionar o diagnóstico. Dados relativos às taxas de morbidade e letalidade, tipo de alimentação, presença de plantas tóxicas ou pastagens próxima a lavouras, histórico de vacinações contra clostridioses, raiva e

IBR, evolução da doença e outros sinais intercorrentes, são fundamentais para que se estabeleça o diagnóstico (Claus et al., 2002).

Devido à ausência de sinais patognômicos e proximidade entre curso e manifestação clínica, outras doenças que induzem sintomatologia nervosa devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da meningoencefalite por BoHV-5 nos bovinos (Flores et al., 1998). As duas doenças mais importantes são a raiva e a polioencefalomalacia (Vasconcelos et al., 1993; Salvador et al., 1998; Pedraza et al., 2004; De Paula et al., 2005; Riet-Correa et al., 2006), embora outras, tais como o botulismo, intoxicação hídrica, listeriose, abscessos cerebrais e intoxicação por plantas hepatotóxicas do gênero *Senecio*, também devam ser observadas (Flores et al., 1998; Roehe et al., 1998; Salvador et al., 1998; Halfen e Vidor, 2001). A raiva, uma das viroses mais importantes para a pecuária e saúde pública no Brasil (Lima et al., 2005), caracteriza-se por lesões de encefalite e mielite linfocitária focal e difusa, preferencialmente no tronco encefálico, cerebelo, medula espinhal (Salvador et al., 1998; Langohr et al., 2003), hipocampo e gânglios trigeminiais (Jones et al., 2000), podendo inclusive serem discretas ou ausentes e com presença de corpúsculos de Negri em grande parte dos casos (Jubb e Huxtable, 1993). O vírus pode ainda ser identificado por imunofluorescência direta e teste de inoculação em camundongos (Salvador et al., 1998; Peixoto et al., 2000). O isolamento de BoHV-5 em um novilho com raiva (Spilki et al. 2003), associado ao fato de que estudos retrospectivos frequentemente tem detectado BoHV-5 em materiais com diagnóstico negativo para raiva (Botelho, 2000), reforçam a importância da diferenciação entre estas enfermidades.

A polioencefalomalacia (PEM), distúrbio neurológico de ruminantes caracterizado por necrose cerebrocortical, devido provavelmente à deficiência de tiamina (Gould, 1998; Hübner et al., 1999; Lemos e Nakazato, 2001), tem sido confundida com meningoencefalite por BoHV-5. Ambas possuem características epidemiológicas similares: mesma distribuição geográfica, ocorrem de forma esporádica ou como surtos com baixa morbidade, além de poderem afetar animais entre quatro meses e sete anos de idade, criados extensivamente e em qualquer época do ano (Hübner et al., 1999). Alguns autores conseguiram reativar latência de BoHV-5 após indução experimental de PEM e levantam a hipótese de que lesões profundas de malacia, especialmente nos núcleos da base, tálamo e mesencéfalo, em alguns casos de meningoencefalite por BoHV-5, poderiam ser devido à reativação do vírus em animais previamente afetados por PEM (Hübner et al., 1999; David et al., 2007). A presença de lesões inflamatórias na substância branca e em regiões extracorticais e a identificação de corpúsculos de inclusão intranucleares em astrócitos e neurônios permitem o diagnóstico de encefalite por BoHV-5. A possibilidade de dificuldade de diagnóstico entre estas duas doenças reforça a necessidade de exame microscópico detalhado de todos os segmentos do encéfalo e se possível de todo o SNC (Salvador et al., 1998).

Surtos de botulismo podem ser divididos de maneira geral em dois grupos: os associados à deficiência de fósforo e osteofagia, e os que afetam diversas espécies domésticas e que estão relacionados à ingestão da toxina presente no alimento ou na água (Kriek e Odendaal, 1994 citado por Lemos, 2005). Deste modo o diagnóstico de botulismo baseia-se no quadro clínico e epidemiológico e na ausência de lesões macroscópicas e histológicas significativas (Santos et al.; 1993; Lisboa et al., 1996). Na listeriose

ocorre uma meningoencefalite centrada na ponte e bulbo e a inflamação é tipicamente, uma mistura de padrões supurativos e não supurativos (Salvador et al., 1998).

Embora de ocorrência rara, casos de meningoencefalite por BoHV-1 em bezerros recém-nascidos (Penny et al., 2002) e em uma vaca de três anos e meio de idade (Roels et al., 2000) foram relatados. Nos bezerros o quadro de encefalite foi acompanhado por descarga nasal serosa, presença de pequenas placas necróticas no palato mole e laringite, enquanto que no adulto os sintomas foram caracterizados somente por uma progressiva incapacidade de se manter em estação (Roels et al., 2000; Penny et al., 2002). No Brasil foi confirmada, por meio de isolamento viral e PCR, a presença de BoHV-1 em uma amostra de cérebro de bovino com sintomas neurológicos, dentre um total de 1147 amostras analisadas no Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo (Lorenzin et al., 2004). Em surto ocorrido no Japão, provavelmente de uma amostra proveniente de vacina viva para IBR, os sintomas foram de perda de apetite, descarga nasal e salivação aparente, opistótono, depressão, andar em círculos e incoordenação. À necropsia observaram-se áreas de hemorragia e malacia no córtex cerebral anterior, além de extensas áreas de necrose por todo o córtex e presença de corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos em neurônios (Furuoka et al., 1995; Horiuchi et al., 1995). Deste modo a utilização de técnicas de restrição enzimática do genoma ou PCR devem ser adotadas para estabelecimento do diagnóstico diferencial entre BoHV-1 e BoHV-5 (Ashbaugh et al., 1997; Alegre et al., 2001; D'Arce et al., 2002; Claus et al., 2005).

Silva et al. (2007b) analisaram 40 amostras de casos clínicos de herpesvirose provenientes de quatro estados brasileiros, Uruguai e Argentina. Deste total, 26 eram

de bovinos que apresentaram doença neurológica na forma de surtos ou casos isolados. Dentre as 26 amostras, 21 (80,7%) foram identificadas como BoHV-5 e cinco (19,3%) como BoHV-1. Além das 21 amostras de BoHV-5 isoladas de animais com neuropatia, o vírus também foi isolado no sêmen de dois touros saudáveis e do baço de um bezerro com doença sistêmica. A identidade destes vírus foi confirmada pelo sequenciamento e restrição enzimática dos amplicons, por testes de neutralização cruzada e por análise de reatividade com anticorpos monoclonais (Silva et al., 2007a). Estes resultados demonstram que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 estão envolvidos com frequência em condições clínico-patológicas classicamente atribuídas a outra espécie de BoHV. Isso reforça a necessidade de se identificar e distinguir corretamente estes vírus após sua detecção em amostras clínicas (Silva et al., 2007b).

Outra doença importante que deve ser considerada é a enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D. Caracteriza-se pela manifestação de sinais clínicos relacionados a uma síndrome cortical e com presença em alguns casos, de encefalomalacia simétrica focal. O quadro pode ser agudo variando de seis a 18 horas ou sub-agudo, estendendo-se por vários dias. A ausência de encefalite na enterotoxemia, associada à presença de

lesões como edema perivascular proteináceo no cérebro, além de edema proteináceo intersticial e intra-alveolar nos pulmões, são achados importantes para diferenciar esta doença da meningoencefalite por BoHV-5 (Facury Filho, 2004).

A tabela a seguir resume algumas características das principais neuropatias dos bovinos, que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

Tabela 01. Distúrbios neurológicos em bovinos.

Doença	Idade/categoria	Sinais clínicos	Lesões
Raiva	Todas as idades	Forma paralítica é a mais comum. Pode apresentar mugidos contínuos, tenesmo, salivação, constipação e paralisia.	Meningoencefalite não-purulenta, corpúsculos de inclusão acidofílicos no citoplasma de neurônios (corpúsculos de Negri).
Meningoencefalite por BoHV-5	Todas as idades	Depressão, nistagmo, tremores musculares, andar em círculos, cegueira, bruxismo, movimentos de pedagem.	Meningoencefalite não-purulenta, vasculite, necrose neuronal, corpúsculos acidofílicos intranucleares nos astrócitos e neurônios.
Febre catarral maligna	Geralmente em adultos	Ocorrência esporádica, menos freqüente em surtos. Associado à presença de ovinos, principalmente na época da parição. Descarga nasal mucopurulenta, febre, edema de pálpebras, opacidade de córnea, congestão de vasos episclerais. Diarréia ou constipação. Hiperemia ou ulceração nas mucosas, dermatite, depressão profunda, incoordenação, convulsões e paralisia.	Histologia: encefalomielite não-purulenta, arterite e exsudato fibrinoso nas meninges. Lesões generalizadas de proliferação de células linfóides, vasculite necrótica e necrose de epitélios.
Listeriose	Em todas as idades, mas principalmente em adultos.	Salivação, hipoalgesia facial, ptose, perda do reflexo palpebral de defesa, andar em círculos, ataxia, hemiparesia.	Pode não haver lesões macroscópicas ou observar-se pequenos focos (microabscessos) marrom-avermelhados no tronco encefálico. Histologia: microabscessos no tronco encefálico, manguitos perivasculares mononucleares.
Botulismo	Animais adultos	Paralisia flácida	Sem lesões
Polioencefalomalacia	Animais jovens/ confinados	Diarréia, mobilidade diminuída, nistagmo, decúbito, cegueira, opistótono, convulsões terminais.	Necrose da substância cinzenta do encéfalo.
Enterotoxemia por <i>C. Perfringens</i> tipo D	Todas as idades	Apatia, ataxia, opistótono, mioclonias, espasmos musculares, movimentos de pedagem, cegueira, nistagmo.	Edema perivascular proteináceo no cérebro, edema pulmonar, encefalomalacia simétrica focal.

Fonte: Adaptado de Barros (2003).

2.10 Controle e profilaxia

Não há tratamento específico para a meningoencefalite por BoHV-5 (George, 1991) e embora não sejam descritas formas de controle e profilaxia aplicadas diretamente à infecção, a adoção de alguns procedimentos de manejo e programas de vacinação, podem contribuir para minimizar o aparecimento de casos da enfermidade (Rissi et al., 2007).

Devido às similaridades em aspectos biológicos e moleculares entre o BoHV-5 e BoHV-1, ocorrem significativas reações

sorológicas entre eles (Fenner et al., 1993; Halfen et al., 2000) e diversos autores tem demonstrado relativa proteção cruzada contra enfermidade neurológica por BoHV-5 em animais vacinados contra IBR (Cascio et al., 1999; Beltrão et al., 2000; Vogel et al., 2002; Del Médico Zajac et al., 2006). A ampla distribuição da infecção pelo BoHV-1, além do uso da vacinação em larga escala, são utilizados para explicar a baixa ocorrência de BoHV-5 na Europa e América do norte (Ely et al., 1996; Cascio et al., 1999).

Durante infecção experimental com BoHV-5 em bezerros neonatos foi demonstrado

que animais que receberam colostro de vacas rotineiramente vacinadas com vacina viva modificada contra BoHV-1.1, apesar de tornarem-se infectados, não manifestaram enfermidade neurológica ou lesões à necropsia e histologia. Os autores concluíram que os anticorpos colostrais dirigidos contra o BoHV-1.1 podem ter sido responsáveis por esta proteção (Belknap et al., 1994). Por outro lado, Silva et al. (2006) examinando proteção cruzada para BoHV-5 em coelhos e bezerros vacinados com vacina contendo BoHV-1 gE-negativo, observaram falha na proteção dos coelhos e proteção limitada para os bezerros, já que todos eliminaram BoHV-5 via secreção nasal e alguns manifestaram sinais brandos da enfermidade e desenvolveram lesões cerebrais. Spilki et al. (2004) em experimento realizado com bezerros, concluíram que a vacina contra BoHV-1 por eles testada, não foi capaz de conferir proteção total para os animais desafiados com amostras de BoHV-5.

Os surtos da doença ocorrem com maior frequência em rebanhos submetidos a situações de estresse ou após introdução de animais portadores. O vírus usualmente provém de uma infecção latente e é disseminado aos animais susceptíveis. Transporte, mudanças bruscas na dieta e condições climáticas adversas podem desencadear a doença (Fenner et al., 1993).

Além da vacinação, outras medidas podem ser adotadas para prevenir ou reduzir os prejuízos ocasionados pela enfermidade. Dentre estas medidas recomenda-se: testar sorologicamente os animais a serem introduzidos no rebanho, minimizar as situações de estresse, sobretudo no desmame, e isolar os animais afetados. Em rebanhos com número limitado de animais sorologicamente positivos, a identificação e o descarte destes animais podem ser recomendados como forma de erradicar definitivamente a infecção da propriedade (Rissi et al., 2007).

2.11 Utilização de coelhos como modelo experimental

Há até cerca de uma década, os estudos da neuropatogenicidade do BoHV-5 eram limitados somente a bovinos (Johnston et al., 1964; Hall et al., 1966; Bagust, 1972; Bagust e Clark, 1972; Belknap et al., 1994; Meyer et al., 1996) e nenhum modelo com animais de laboratório tinha sido descrito para infecção aguda ou latente. Coelhos já haviam sido infectados experimentalmente com BoHV-1 e sugeridos como um possível modelo laboratorial para estudo da neuropatogenicidade do BoHV-5 (Kelly, 1977; Lupton et al., 1980). French (1962b) não conseguiu reproduzir a enfermidade em coelhos através da inoculação intravenosa, subcutânea e intradermal, da amostra N569 de BoHV, hoje reconhecida como BoHV-5.

A inoculação de BoHV-1 via sacos conjuntivais de coelhos foi adequada para estudo de infecções clínicas e latentes com este vírus, consistindo com observações feitas em bovinos naturalmente infectados (Rock e Reed, 1982). Outra via bastante importante, tratando-se de um vírus que causa sintomatologia respiratória, é a infecção pela via intranasal. A dificuldade inicial para a utilização desta via, advinha do fato do pequeno tamanho, anatomia peculiar e sensibilidade aguda das narinas e fossas nasais da espécie. As tentativas de utilizar a técnica de instilação nasal da suspensão viral eram consideradas pouco confiáveis, já que mesmo sedados os animais espirravam e vocalizavam, tornando incerta a quantidade de material inoculada (Brown e Field, 1990). O desenvolvimento de uma técnica de inoculação com auxílio de agulha, onde a suspensão é injetada via aberturas tréfinas diretamente nos seios paranasais (Brown e Field, 1990) resolveu os problemas supracitados e vem sendo utilizada com sucesso.

Meyer et al. (1996) testaram a adequação do coelho como modelo experimental para infecção com BoHV-5 pelas vias intraconjuntival, intracerebral e intranasal. A inoculação na conjuntiva induziu proliferação viral na mucosa ocular e na cavidade nasal, mas os animais não manifestaram sintomas neurológicos. As vias intracerebral e intranasal produziram meningoencefalite fatal, porém a primeira foi considerada menos importante, já que não imita a infecção natural. Os autores concluíram que o método para inoculação intranasal desenvolvido por Brown e Field (1990) mostrou-se altamente reproduzível para BoHV-5 e que a inoculação de coelhos pela via intranasal é uma ferramenta valiosa para o estudo comparativo da neuropatogenicidade do BoHV-5 e BoHV-1.

Posteriormente vários trabalhos corroboraram a importância do coelho como modelo experimental para infecção por BoHV-5, com a reprodução da sintomatologia neurológica variando entre 14,8% e 100% dos animais infectados com diversas amostras do vírus (Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a; Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002). BoHV-5 foi consistentemente isolado do bulbo olfatório, córtex anterior, córtex posterior, córtex dorso lateral, hipocampo e mesencéfalo. Vírus infeccioso também foi recuperado da medula oblonga, cerebelo, gânglio trigeminal e córtex posterior e as alterações microscópicas incluíam meningoencefalite não supurativa, manguitos perivasculares, gliose e degeneração neuronal, principalmente localizadas nos córtex olfatório e anterior (Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a).

O quadro clínico relatado é caracterizado por excitabilidade ou depressão, tremores, bruxismo, andar ou correr em círculos, opistótono, incoordenação, queda lateral, pedalagem, cegueira transitória, além de

convulsões do tipo Jackson (movimentos musculares iniciando-se sobre o nariz e boca e espalhando-se sequencialmente para os músculos do pescoço e membros) (Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a; Spilki et al., 2002).

Em estudos para investigar a cinética da infecção viral por BoHV-5 em coelhos, foram feitos testes para infectividade em vários fragmentos de SNC em intervalos pré-determinados após inoculação viral. O vírus foi primeiramente detectado no bulbo olfatório 48 horas pós-inoculação (pi), seguido pelo córtex olfatório entre 48 e 72h pi. De 72 a 96h a infectividade foi também detectada no gânglio trigeminal, ponte e córtex cerebral (Beltrão et al., 2000).

As duas principais vias de acesso do BoHV-5 ao SNC de coelhos infectados são a via olfatória, através das terminações nervosas dos neurônios bipolares que inervam a mucosa olfatória e projetam-se para o bulbo olfatório, e a via trigeminal, através dos axônios dos neurônios pseudounipolares, cujos corpos celulares localizam-se no gânglio trigêmeo e projetam terminações aos núcleos sensoriais da ponte e do bulbo (Chowdhury et al., 1997). Para testar a importância destas vias, coelhos foram submetidos à ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios (BOs) e posteriormente inoculados com BoHV-5. Todos os animais do grupo controle (n = 10) desenvolveram enfermidade neurológica, com início dos sinais clínicos de 5 a 10 dias pi. No grupo submetido ao procedimento cirúrgico (n = 11) somente um animal ficou doente e com sinais iniciando-se mais tardiamente (dia 17 pi). A administração de dexametasona aos animais sobreviventes (n = 10) no dia 50 pi resultou em excreção viral em secreções nasais e/ou oculares por oito meses, demonstrando que o vírus foi capaz de atingir o gânglio trigêmeo durante a infecção aguda. Estes resultados demonstraram que a rota olfatória

representa a via principal, mas não a única, de acesso ao SNC de coelhos infectados com BoHV-5. Para investigar o papel de uma segunda possível via de acesso, grupos de coelhos controle e submetidos à ablação dos BOs foram inoculados no saco conjuntival (IC), após o qual o vírus poderia utilizar o ramo oftálmico do nervo trigêmeo para invadir o cérebro. O mesmo percentual de animais nos dois grupos (83%) desenvolveu doença neurológica após inoculação IC, diferindo apenas na média de dias do início dos sintomas, que foi de 15,3 dias para o grupo controle e 12,7 dias para os animais sem os BOs. Os autores concluíram que tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o cérebro de coelhos infectados experimentalmente. A inoculação intranasal resulta em transporte rápido e eficiente pela via olfatória, com a via trigeminal servindo de acesso mais lento e menos eficiente. Já a inoculação intraconjuntival resulta em transporte e invasão eficientes, porém mais tardios, provavelmente pela via trigeminal (Diel et al., 2005).

Mayer et al. (2006) estudaram a reativação da infecção latente e distribuição do DNA viral no SNC de coelhos experimentalmente infectados e observaram presença maior no gânglio trigeminal, cerebelo e córtex anterior dos animais não submetidos à reativação. No grupo que foi tratado com dexametasona, o DNA viral mostrou uma ampla distribuição, com alta frequência no córtex cerebral anterior e dorso-lateral, ponte, tálamo e mesencéfalo. Estes resultados demonstraram que a latência por BoHV-5 é estabelecida em várias áreas do encéfalo de coelhos e que a reativação leva a uma ampla distribuição do DNA viral latente.

Os trabalhos supracitados reafirmam que o coelho, já há algum tempo utilizado para infecções experimentais com o BoHV-1, também é um modelo adequado para estudo

do BoHV-5, pois manifesta características patogênicas e clínicas semelhantes às descritas na infecção natural em bovinos e representa um custo muito mais acessível para pesquisa.

2.12 Infecções herpéticas em coelhos

Nesburn (1969) descreveu um agente com características físicas, químicas, citopáticas, histológicas e de microscopia eletrônica atribuídas a um vírus do grupo dos herpes, que foi isolado de cultura de células de rim de coelho, nomeado pelo autor de *Herpesvirus cuniculi*. Evidências preliminares indicaram que anticorpos contra o vírus foram encontrados em amostras de soro de alguns coelhos aparentemente normais, da raça Nova Zelândia. Todos os relatos de isolamento do *H. cuniculi* foram feitos a partir de coelhos sem sintomatologia clínica e doença natural não foi atribuída ao mesmo. A prevalência do vírus na população de coelhos é desconhecida (Maré, 1974).

Hinze (1971) isolou um vírus de cultura de células preparadas de um “pool” de tecido renal de três aparentemente saudáveis coelhos *cottontail* (*Sylvilagus floridanus*). Baseando-se em características físicas, químicas e biológicas, o agente foi considerado como membro da família *Herpesviridae* e sugeriu-se a denominação de *Herpesvirus sylvilagus* para o mesmo. A inoculação experimental de *H. sylvilagus* em coelhos *cottontail* resultou em infecção crônica com persistência do vírus no sangue, presumivelmente nos leucócitos, pelo resto da vida do animal. Os coelhos persistentemente infectados apresentaram pronunciada leucocitose e linfocitose (Hinze e Walker, 1964 citados por Hinze, 1971). Repetidas tentativas falharam em infectar coelhos albinos da raça Nova Zelândia com *H. sylvilagus* (Hinze, 1971).

Tanto o *H. sylvilagus* dos coelhos *cottontail* quanto o *H. cuniculi* dos coelhos domésticos, possuem a capacidade de

persistir nos seus hospedeiros infectados em estado de infecção subclínica. A presença destas infecções, quando não reconhecidas, poderia resultar em considerável confusão em resultados experimentais (Maré, 1974). Surtos de infecções letais em coelhos domésticos no Canadá, caracterizadas por dermatite hemorrágica, pneumonia e necrose esplênica, foram atribuídas a um herpesvírus ainda não classificado (Onderka et al, 1992).

Além das infecções pelos herpes leporídeos, os coelhos podem ser naturalmente infectados com *Herpesvirus humano 1* (HHV-1) anteriormente denominado de vírus herpes simplex 1 (HSV-1). Weissenböck et al. (1997) e Grest et al. (2002) fizeram os primeiros relatos de infecção natural por HHV-1 em coelhos domésticos. Ambos os casos foram isolados e afetaram coelhos criados como animais de companhia, que subitamente iniciaram quadro de enfermidade neurológica. Os autores sugerem que as fontes de infecção para os animais, tenham sido pessoas com lesões herpéticas, que tinham contato próximo com os coelhos.

Tentativas em induzir transmissão transplacentária em coelhos *cottontail* infectados com *H. sylvilagus*, bem como a utilização de pulgas e mosquitos como vetores, não obtiveram êxito (Spieker e Yuill, 1977a; Spieker e Yuill, 1977b). Entretanto infecção de animais prenhes com altas concentrações de HHV-1 resultou em infecção fetal (Middelkamp et al., 1967 citado por Spieker e Yuill, 1977a). Até o presente momento é desconhecida a real situação das herpesviroses na população de coelhos no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células e vírus

Os procedimentos de multiplicação, detecção, quantificação de vírus e soro-neutralização foram realizados com células MDBK (Mardin-Darby Bovine Kidney – ATCC CCL-22). As células foram cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) (Sigma, EUA), suplementado com penicilina (1,6mg/l), estreptomicina (0,4mg/l), fungizone (2,5mg/l) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, EUA) inativado e livre de *Mycoplasma* e do Vírus da Diarréia Viral Bovina. Para a inoculação viral, foi utilizada a monocamada celular com uma confluência de 90%.

O isolado brasileiro Mutum de BoHV-5, proveniente de um bovino atendido no Hospital Veterinário da UFMG e originário do município de Mutum (MG), foi utilizado neste trabalho. Alíquotas deste vírus, na 3ª passagem, estavam armazenadas a -70°C no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Em razão do baixo título da amostra optou-se por fazer mais duas passagens em células MDBK. Após nova titulação, foi obtido título de $10^{5,67}$ TCID₅₀ na 5ª passagem.

3.2 Titulação

Foram implantadas 6×10^4 células por cm² em placa de 96 poços e no mesmo dia foram inoculadas várias diluições (10^{-3} a 10^{-10}) do vírus a ser titulado. Em seguida acrescentou-se MEM suplementado com antibióticos e SFB a 2,5%. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 4 dias. A leitura foi realizada com auxílio de microscópio óptico. O título foi avaliado pela presença ou ausência de efeito citopático nas células e o TCID₅₀/50µl calculado pelo método Reed-Muench.

3.3 Multiplicação Viral

3.3.1 Produção em larga escala

A multiplicação viral foi feita em células MDBK, utilizando-se garrafas “whiskão” de 238cm². Antes da inoculação, a monocamada foi lavada duas vezes com PBS 1X (0,01M Na₂HPO₄, 0,9% NaCl, pH 7,5) e infectada com 15ml de solução contendo vírus. Após incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 60 minutos (período de adsorção) as garrafas foram acrescidas com aproximadamente 150ml de MEM suplementado com penicilina (1,6mg/l), estreptomicina (0,4mg/l), fungizone (2,5mg/l) e 2,5% de SFB (GibcoBRL, EUA). As garrafas foram novamente incubadas até que efeito citopático de 80 a 90% fosse alcançado. Após efeito citopático desejado, as garrafas foram congeladas (-20°C) e descongeladas três vezes e alíquotas dos vírus foram posteriormente estocadas a -70°C.

3.3.2 Purificação

O sobrenadante viral proveniente das garrafas infectadas foi gotejado com uma solução saturada de sulfato de amônio até atingir a concentração de 60% desta na solução final. Em seguida a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 10415g e 4°C (centrífuga Sorvall RCSB, rotor GSA). O sobrenadante foi vertido e o precipitado ressuspenso em 5ml de solução de Tris 10mM, pH 8,0. Em seguida o sedimento dissolvido foi coletado e ultracentrifugado em colchão de sacarose a 36% e Tris 10mM, pH 8,0 por duas horas, a 18226g e 4°C (Rotor Sorvall AH629). O sedimento produzido foi então homogeneizado em 24ml de Tris 10mM e novamente ultracentrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o sedimento foi homogeneizado em 400µl Tris e o material armazenado a -70°C em alíquotas de 10µl. Após a purificação a amostra foi novamente

titulada alcançando o título de 10^{7,8} TCID₅₀/50µl.

3.4 Desenho experimental

Oito coelhos foram utilizados no experimento, sendo que seis animais foram infectados e dois permaneceram como controle. Os animais foram observados diariamente durante todo o experimento em relação a mudanças comportamentais e ingestão de água e alimentos. O monitoramento da replicação viral nos coelhos foi feito por meio de suabes nasais, coletados nos dias 0, 3, 5 e 12 pós-inoculação (pi). Amostras de sangue foram coletadas em duas alíquotas, para realização de soroneutralização e hemograma, nos dias 0, 5, e 12 pi. Metade (três) dos animais infectados foi eutanasiada no dia 5 pi, juntamente com o animal controle 1 (C1), enquanto que os três coelhos restantes, mais o controle 2 (C2), foram eutanasiados no dia 12 pi, todos sob as mesmas condições. As necropsias foram realizadas imediatamente após a eutanásia dos mesmos. Será utilizada a denominação de animais do 5° dia e animais do 12° dia, para os coelhos infectados, de acordo com o período em que os mesmos foram sacrificados. Para a realização da eutanásia, foi adotado um método químico, através da utilização de sobredose (30 mg/kg) de Tiopental sódico¹ pela via intraperitoneal.

¹ Tiopentax® - Cristália – Porto Alegre, RS, Brasil

Tabela 02. Via de inoculação, dose infectante e dia da eutanásia dos coelhos infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

	Animais	Via de inoculação, dose infectante e dia da eutanásia
Animais do 5° dia	Infectados 1, 2 e 3	Inoculados pela via intranasal com 1 ml (5×10^7 TCID ₅₀) do isolado Mutum de BoHV-5 e sacrificados no dia 5 pi
Controle 1	C1	Inoculados pela via intranasal 1ml de PBS 1X e sacrificados no dia 5 pi
Animais do 12° dia	Infectados 4, 5 e 6	Inoculados pela via intranasal com 1 ml (5×10^7 TCID ₅₀) do isolado Mutum de BoHV-5 e sacrificados no dia 12 pi
Controle 2	C2	Inoculados pela via intranasal 1ml de PBS 1X e sacrificados no dia 12 pi

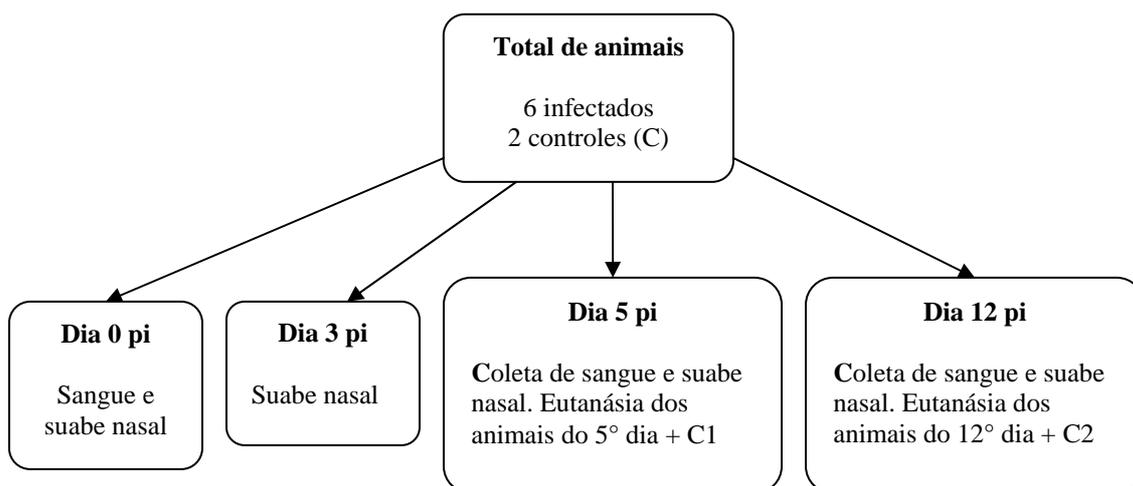


Figura 1: Datas e procedimentos realizados com coelhos infetados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5.

3.4.1 Animais

A inoculação experimental foi realizada no Setor de Pequenos Animais do Laboratório de Biossegurança nível P3+ do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) em

Pedro Leopoldo (MG), do dia 23 de Julho a 06 de Agosto de 2007. Os animais eram provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Viana, pertencente à UFMG e localizada no município de Igarapé (MG). Foram utilizados oito

coelhos, independente de sexo, da raça Nova Zelândia, com 40 dias de idade e pesando entre 900g a 1,1kg. Os mesmos foram mantidos individualmente em caixas padrão para roedores e receberam alimento e água *ad libitum*. As caixas ficaram em estantes ventiladas, em área de isolamento, e os coelhos do grupo controle ficaram em infectório separado dos inoculados. Após alojados nas dependências do laboratório, os animais ficaram dois dias em adaptação ao novo ambiente antes de serem inoculados. Durante todo o experimento foi fornecida a mesma ração que os animais vinham comendo desde a desmama. Todos os procedimentos de limpeza das gaiolas, fornecimento de alimento e coleta de amostras, seguiram sempre a mesma seqüência, iniciando-se pelos animais controle e depois prosseguindo com os infectados.

3.4.2 Inoculação

A amostra purificada do vírus Mutum foi transportada de Belo Horizonte (MG) até a cidade de Pedro Leopoldo (MG) em caixa de isopor lacrada contendo gelo seco, na véspera da infecção dos coelhos. Ao chegar ao LANAGRO, a amostra foi imediatamente estocada em freezer a -70°C. Antes da inoculação viral, os animais foram sedados por meio da administração intramuscular de 0,2ml (2mg) de Tiletamina/Zolazepan². O vírus foi então descongelado em banho de gelo e diluído na proporção de 300µl para 5,7ml de PBS 1X (0,01M Na₂HPO₄, 0,9% NaCl, pH 7,5). Seis coelhos foram inoculados nos seios paranasais através das aberturas tréfinas, de acordo com técnica adaptada de Brown e Field (1990). Cada coelho foi inoculado com 0,5ml de suspensão viral em cada narina, que foi equivalente a 50µl de vírus por animal ou 5x10⁷ TCID₅₀. Logo após a inoculação, a cabeça foi mantida para cima

² Zoletil® - Virbac Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil.

durante poucos segundos para que fosse conseguida uma distribuição uniforme do inóculo na cavidade nasal. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, porém cada animal recebeu 0,5ml de PBS 1X por narina. Todo o procedimento envolvendo os animais foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA – UFMG) em 04 de Abril de 2007, sob protocolo número 201/2006.

3.4.3 Coleta de amostras

Após as coletas das amostras, os suabes nasais foram imergidos em 0,5ml de PBS 1X suplementado com penicilina (3,2mg/l), estreptomicina (0,8mg/l), fungizone (5mg/l) e em seguida estocados a -70°C.

Para a coleta de sangue, os animais foram contidos com uma toalha e em seguida fez-se uma pequena incisão com o auxílio de uma lâmina inoxidável estéril, na veia marginal da orelha. Para promover vasodilatação local e facilitar o processo de coleta, algodão embebido em xilol foi passado na extremidade da orelha. Na lateral do pavilhão auricular, onde foi feita a incisão, um pouco de vaselina líquida foi utilizada para evitar a aderência de coágulos aos pêlos. Ao final do procedimento a área onde estava o xilol foi lavada abundantemente com água e sabão até a retirada completa do mesmo.

As amostras de sangue de cada animal foram coletadas em duas alíquotas, uma em tubos sem EDTA e outra em eppendorfs com anticoagulante. Para a obtenção de uma maior quantidade de soro, os tubos foram mantidos em ângulo de aproximadamente 45° em temperatura ambiente até que o sangue coagulasse (2 a 3 horas). A seguir permaneceram em geladeira por cerca de uma hora e meia. Após esta fase, finalmente a amostra foi centrifugada a 5000rpm por 10 minutos e o soro, após aliqotado, foi acondicionado em

eppendorfs e estocado a -70°C . Posteriormente a amostra foi descongelada e avaliada no teste de soroneutralização viral, para a detecção de anticorpos anti-BoHV-5.

A alíquota com anticoagulante foi coletada em eppendorfs, na proporção de $50\mu\text{l}$ de EDTA para $450\mu\text{l}$ de sangue. Após a coleta, as amostras foram armazenadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica de UFMG, para a realização dos hemogramas.

A necropsia foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais nos dias previamente estabelecidos. Fragmentos de córtex cerebral, cerebelo, tronco encefálico, gânglio trigêmeo, medula cervical, medula torácica e medula lombar foram coletados em duplicata, sendo parte acondicionada em frascos com formalina tamponada a 10% e parte em eppendorfs, que foram rapidamente congelados a -70°C . Foi coletada medula sacral e secções de coração, pulmão, rim, baço, fígado e pâncreas, para exame histológico. Da mesma maneira, estes materiais foram conservados em frascos com formalina tamponada a 10%. Com o intuito de facilitar a coleta dos fragmentos de medula, as porções destinadas à análise histológica foram fixadas em formalina juntamente com a vértebra, tendo sido retiradas das mesmas somente no momento do processamento. Para evitar contaminação das amostras teciduais destinadas à virologia, o instrumental utilizado na coleta foi imerso sequencialmente em três frascos: o primeiro com água, depois álcool 70% e o último novamente com água, sempre que foi mudada a área de coleta.

Após as necropsias e coleta do material, todas as carcaças, maravalha das gaiolas, fômites e restos de ração foram embalados em sacos plásticos apropriados e conduzidos dos infectórios diretamente para a autoclave. Após autoclavação, todo o

material foi enterrado em área de uso exclusivo para tal fim.

Ao final do experimento as salas foram higienizadas e desinfetadas. Cerca de 20 frascos contendo algodão embebido em formol puro foram distribuídos pelos infectórios, inclusive sobre os móveis e dentro das estantes ventiladas. Cada sala foi mantida isolada e com a saída de ar desligada por um período de 48 horas. Ao término deste período os exaustores foram ligados até que saísse completamente o odor.

3.5 Processamento laboratorial das amostras

3.5.1 Hemograma

Para a realização dos hematócritos, tubos capilares com as amostras foram centrifugados à 13000g por cinco minutos em microcentrífuga (Centrobio). Após a sedimentação, as leituras foram feitas em cartão de leitura de microhematócrito (Stockham e Scott, 2002).

Os valores da concentração de hemácias e hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (HCM) e RDW (*red cell distribution width*) foram obtidos em contador hematológico automático da marca Abacus Junior Vet (GmbH, Wein Austria).

O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos por meio de cálculos, segundo Stockham e Scott (2002).

3.5.2 Soroneutralização

Para o teste de soroneutralização o vírus foi diluído, em banho de gelo, para $100\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ e foi feita retrotitulação. Foram colocados em cada placa de 96 poços, $50\mu\text{l}$ de meio MEM sem SFB, tratado com penicilina/estreptomicina (1%)

e fungizone 1X (0,5%). Nos poços da linha “A” da placa foram adicionados em duplicata, 50µl de cada soro a ser testado (6 soros/placa). Em seguida todos os poços desta linha foram homogeneizados e 50µl foram transferidos para a linha “B”, com auxílio de pipeta multicanal. Este procedimento foi repetido até a diluição de 1:256. Após o término desta etapa, cada placa foi acondicionada em estufa (37°C) de CO₂ (5%) antes do início da preparação da placa seguinte, para que o pH do meio não sofresse alterações. Finalmente foram acrescentados 50µl da suspensão viral em cada poço e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação foram adicionados 50µl de suspensão de células com 300.000 células/ml em MEM com 5% de SFB. A leitura foi feita com quatro dias de incubação. Foram utilizadas amostras padrão de BoHV-5 (EVI-88 - 10^{5,67} TCID₅₀) e de BoHV-1 (Colorado 1-ATCC VR864 - 10^{5,6} TCID₅₀).

3.5.3 Titulação viral dos suabes nasais

O material proveniente dos suabes nasais foi descongelado em banho de gelo e diluído até 10⁻². Para a titulação das amostras, foram preparadas duas placas de 96 poços e implantadas 60.000 células por cm², 24 horas antes da inoculação. Neste momento a monocamada estava com confluência em torno de 80 a 90%. Em placas sem células acrescentou-se 50µl de MEM sem SFB e em seguida 50µl das amostras a serem testadas. Retirou-se cuidadosamente o meio das placas com células, evitando que as ponteiros provocassem lesões na monocamada. Foi feito um “pool” das amostras no mesmo tempo de coleta, dos animais do 5º dia e outra dos animais do 12º dia. As mesmas foram então homogeneizadas com meio sem soro e transferidas para as placas com a monocamada celular, e distribuídas da seguinte maneira:

SUABES NASAIS: PLACA 1											
D0A Puro	D0A 10 ⁻¹	D0A 10 ⁻²	D0B Puro	D0B 10 ⁻¹	D0B 10 ⁻²	D3A Puro	D3A 10 ⁻¹	D3A 10 ⁻²	D3B Puro	D3B 10 ⁻¹	D3B 10 ⁻²
D0A – Amostras do dia 0 pi, “pool” dos animais do 5º dia; D0B – Amostras do dia 0 pi, “pool” dos animais do 12º dia; D3A - Amostras do dia 3 pi, “pool” dos animais do 5º dia; D3B - Amostras do dia 3 pi, “pool” dos animais do 12º dia.											

SUABES NASAIS: PLACA 2											
D5A Puro	D5A 10 ⁻¹	D5A 10 ⁻²	D5B Puro	D5B 10 ⁻¹	D5B 10 ⁻²	D12 Puro	D12 10 ⁻¹	D12 10 ⁻²	C2D5 10 ⁻¹	C2D5 10 ⁻²	CC
D5A – Amostras do dia 5 pi, “pool” dos animais do 5º dia; D5B – Amostras do dia 5 pi, “pool” dos animais do 12º dia; D12 - Amostras do dia 12 pi, “pool” dos animais do 12º dia; C2D5 – Amostra do animal controle 2 no dia 5pi; CC – Controle celular.											

Após a distribuição, as placas permaneceram em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora, para adsorção viral. Em seguida foi acrescentado 100µl de MEM suplementado com antibióticos e 2,5% de SFB, e as placas foram recolocadas na estufa, nas mesmas condições descritas para

a adsorção. A cada 24 horas as placas foram observadas quanto à presença de efeito citopático e a leitura final foi realizada após quatro dias de incubação, com auxílio de microscópio óptico.

Ao término da leitura final, retirou-se o meio e adicionou-se 100µl de cristal violeta em cada poço. Após o preenchimento de toda a placa, o cristal violeta permaneceu sobre as células por 10 minutos. Em seguida desprezou-se o corante e todos os poços foram abundantemente lavados com água destilada até que todo o excesso fosse retirado. As placas coradas foram então fotografadas em microscópio *Olympus IX-70* (Japão), Câmera *Optometrics DEI-470* (Londres – UK) e processador de imagem *Image-Pro Plus v. 4.0 media cybernetics* (UK).

3.5.4 Titulação viral dos tecidos

Inicialmente todas as amostras de tecidos foram submetidas à pesagem individual dentro dos eppendorfs. Eppendorfs vazios também foram pesados e o valor obtido foi subtraído da pesagem das amostras, para que fosse calculado o valor real das mesmas. Meio MEM foi suplementado com penicilina (3,2mg/l), estreptomomicina (0,8mg/l) e fungizone (5mg/l) e utilizado no processo de maceração tecidual.

Os tecidos foram macerados utilizando-se gral e pistilos de porcelana previamente autoclavados, areia autoclavada e MEM suplementado, na relação de 9ml para cada 1g de tecido. Foi feito um “pool” da mesma área de coleta dos animais do 5º dia e outro

dos animais do 12º dia. Os fragmentos dos coelhos controle foram macerados individualmente.

Dentro do fluxo, as amostras foram colocadas no gral com pequena quantidade de areia, para auxiliar na maceração. Em seguida o pistilo foi utilizado para fazer pressão sobre o tecido, juntamente com a areia, restringindo-se a uma área central do gral, para que fossem minimizadas as perdas do material. O MEM, previamente calculado para cada amostra, era adicionado aos poucos e ao mesmo tempo homogeneizado com o pistilo até que não ficasse nenhum fragmento de tecido visível. O conteúdo foi então acondicionado em tubos falcon ou eppendorfs e armazenado em geladeira por 24 horas. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas a 6708g por 10 minutos, 4°C e o sobrenadante retirado e em seguida congelado a -70°C.

As amostras foram descongeladas em banho de gelo e diluídas seriadamente em tubos eppendorf até 10⁻³. Para a titulação, foram preparadas duas placas de 96 poços para cada grupo de animais (5º e 12º dias), 24 horas antes da inoculação, e o protocolo foi exatamente o mesmo utilizado para a titulação do material proveniente dos suabes nasais. As amostras testadas foram distribuídas como exemplificado a seguir

Animais do 5º dia: PLACA 1											
CTX 10 ⁻¹	CTX 10 ⁻²	CTX 10 ⁻³	CER 10 ⁻¹	CER 10 ⁻²	CER 10 ⁻³	TR 10 ⁻¹	TR 10 ⁻²	TR 10 ⁻³	GT 10 ⁻¹	GT 10 ⁻²	GT 10 ⁻³
CTX – Córtex cerebral; CER – Cerebelo; TR – Tronco encefálico; GT – Gânglio Trigêmeo											

Animais do 5º dia: PLACA 2											
MC 10 ⁻¹	MC 10 ⁻²	MC 10 ⁻³	MT 10 ⁻¹	MT 10 ⁻²	MT 10 ⁻³	ML 10 ⁻¹	ML 10 ⁻²	ML 10 ⁻³	GT(C2) 10 ⁻¹	MUTUM 10 ⁻²	CC
MC – Medula cervical; MT – M. torácica; ML – M. lombar; GT(C2) – Gânglio trigêmeo animal controle 2; Mutum – Controle positivo; CC – Controle celular											

As placas dos animais do 12º dia seguiram praticamente a mesma ordem do esquema exposto acima, diferindo apenas na coluna de número dez, onde testou-se a medula lombar do animal controle 2, na diluição 10⁻¹. Nas duas últimas colunas das placas dois, de ambos os tempos, foram testados o controle viral e o controle celular.

Após a distribuição, as placas permaneceram em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora, para adsorção viral. Em seguida foi acrescentado 100µl de MEM suplementado com antibióticos e 2,5% de SFB, e as placas foram recolocadas na estufa, nas mesmas condições descritas para a adsorção. A cada 24 horas as placas foram observadas quanto à presença de efeito citopático (ECP) e a leitura final foi realizada após quatro dias de incubação, com auxílio de microscópio óptico. As placas foram em seguida coradas e fotografadas como descrito anteriormente no item 3.5.3.

3.5.5 Histopatologia

O material destinado a análises histológicas, que estava em frascos com formalina a 10% tamponada (pH 7,2), foi cortado, devidamente identificado e acondicionado em cassetes. Os fragmentos de tecidos foram então desidratados em soluções alcóolicas crescentes (álcool 70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 1 hora em cada uma delas. Posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Prophet et al., 1992). Os cortes histológicos dos tecidos foram seriados a 4µm de espessura em micrótomo de rotação HM 360 MICROM[®], e posteriormente corados segundo a técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E). Os procedimentos histopatológicos foram realizados no Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, sob a

supervisão da professora Dra. Rosa Maria Esteves Arantes.

3.5.6 Extração de DNA

As amostras do macerado de tecidos e dos suabes nasais utilizadas para extração de DNA e posteriormente para PCR, foram as mesmas usadas na titulação, e desta maneira foi mantido o protocolo de “pool”, como descrito previamente nos itens 3.5.3 e 3.5.4. Foi utilizado o método de extração do DNA das amostras do macerado de tecidos e dos suabes nasais utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico segundo Sambrook et al. (1989), porém com algumas modificações. Foram acrescentados 500µl das amostras a serem testadas e igual quantidade de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2). Após agitação constante, as mesmas foram incubadas a 37°C por cinco minutos. As misturas foram então centrifugadas a 4400g por cinco minutos e a 4°C. Com auxílio de uma micropipeta as duas fases formadas foram separadas, transferindo-se a fase aquosa para microtubos novos, onde foram novamente submetidas ao tratamento com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e, ao sobrenadante final, foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (96:4). A mistura foi agitada rapidamente por inversão dos tubos e centrifugada a 12000g por cinco minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novos tubos. Foram então adicionados 2,5 volumes de etanol 100% gelado e acetato de sódio 3M pH 5,2 até uma concentração final de 0,25M, e o tubo foi invertido suavemente. Em seguida a mistura foi incubada a -20°C *overnight*. O sedimento obtido após 30 minutos de centrifugação a 16000g e 4°C foi ressuspenso em 500µl de etanol 70% gelado. Após suave homogeneização, a mistura foi centrifugada a 17000g por cinco minutos, sob refrigeração de 4°C. O sobrenadante foi

descartado e os microtubos foram invertidos sobre uma folha de papel toalha até estarem completamente secos. Adicionou-se então 20µl de água MilliQ® e a mistura foi homogeneizada cuidadosamente, para que o precipitado aderido à parede do tubo fosse completamente diluído. Após a extração, os DNAs foram estocados sob refrigeração, em geladeira.

3.5.7 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Foram utilizados dois sistemas de PCR específicos para BoHV-5, ambos desenvolvidos para amplificação da glicoproteína G viral, sendo que um deles amplifica um fragmento de 515 pares de base (pb) (Oliveira, 2006) e o outro amplifica um fragmento de 222pb (Gomes et al., 2003). Para maior confiabilidade, os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes, em ocasiões distintas.

Tabela 03. Iniciadores, orientação, localização e tamanho esperado do amplicon.

Iniciadores	Acesso no <i>GenBank</i> – Localização dos iniciadores	<i>Amplicon PCR externa/ PCR semi-nested</i>
Senso Taccctgcgggctggacc	(AY261359) (120131-120149)	
Antisenso gcgatcgcgaggccgatgag	(AY261359) (120732-120713)	602pb / 515pb
Senso interno (<i>nested</i>) Gcgactgggcctggcgct	(AY261359) (120218-120236)	

Fonte: Oliveira (2006).

Tabela 04. Seqüência, orientação e localização do par de iniciadores complementares ao gene US4 do BoHV-5.

Seqüência, orientação e localização	Tamanho do fragmento utilizado
(937-956) 5' TAC GGA CTG CCG GAT TAA CA	
(1158-1133) 3' GTG ACC ACT ACC ACC GCC GCC AAC AT	222pb

Fonte: Gomes et al. (2003).

3.5.7.1 Condições das reações

As reações de PCR foram realizadas a partir do DNA extraído das amostras provenientes da maceração tecidual e suabes nasais, como descrito anteriormente. As reações foram realizadas em volume total de 20µl, onde foi utilizado tampão da enzima *Taq* polimerase 10X (PROMEGA, Brasil), 1,5mM de MgCl₂, 0,4µl de solução a 0,2mM de dNTPs, glicerol 1% (v/v), DMSO 1% (v/v), 0,5U de *taq* DNA polimerase, 5µl de DNA purificado de cada amostra e 10pmol de cada iniciador. O

programa utilizado na PCR consistiu de um ciclo a 95°C por três minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por um minuto, 61°C por um minuto e 72°C por um minuto, e uma etapa final de extensão de sete minutos a 72°C. Em seguida procedeu-se a PCR interna, sendo utilizado como molde 3µl de produto da PCR externa e a mesma concentração de reagentes (Oliveira, 2006).

Conforme descrito por Gomes et al. (2003) para a amplificação de um fragmento de 222pb da glicoproteína G, utilizou-se uma PCR externa e uma interna (*nested*). Estas

também foram realizadas a partir do DNA extraído das amostras provenientes dos tecidos e suabes nasais, em um volume final de 20µl, utilizando-se cerca de 50ng de DNA. Para a amplificação externa, as condições da reação foram as mesmas descritas no protocolo do parágrafo anterior. Para a interna, os tubos de reação continham tampão da enzima *Taq* polimerase 10X (PROMEGA, Brasil), 3mM de MgCl₂, 0,4µl de solução a 0,2mM de dNTPs, glicerol 5% (v/v), DMSO 5% (v/v), 0,5U de *taq* DNA polimerase, 3µl de DNA purificado de cada amostra e 20pmol de cada iniciador. O programa consistiu de 35 ciclos, sendo cada um composto de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 57°C e 60 segundos a 72°C por um minuto. Um tempo inicial de dois minutos a 98°C antes do primeiro ciclo e uma extensão final de dez minutos a 72°C foram incluídos após o final do último ciclo.

3.5.7.2 Análise dos produtos de PCR

Vinte microlitros de produtos de PCR (16µl + 4µl de tampão de amostra) foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% (89 mM Tris-borato, 2mM EDTA, pH 8,2) acrescido de brometo de etídio (0,5µg/ml), sendo utilizado tampão de corrida TBE 0,5X em um sistema de eletroforese horizontal a 100V por uma hora. Para a determinação do tamanho do produto de PCR foi utilizado um padrão de tamanho molecular de 250pb Ladder (Invitrogen, Brasil).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sinais clínicos

A inoculação de coelhos recém-desmamados pela via intranasal com o isolado Mutum de BoHV-5 na dose de 5×10^7 TCID₅₀, provocou doença neurológica em três (50%) dos animais

infectados, porém não causou a morte dos animais no tempo de duração do experimento (12 dias). Sintomatologia clínica foi observada somente nos animais 12° dia. A morbidade e mortalidade de coelhos infectados com BoHV-5 é muito variável e depende da amostra viral utilizada, idade dos animais e via de inoculação (Beltrão et al., 2000). Os dados de morbidade de vários trabalhos experimentais em coelhos com BoHV-5 são muito variáveis, indicando desde a ausência até 100% de doentes, com a utilização de amostras e doses infectantes diferentes (Meyer et al., 1996; Silva et al., 1999a; Beltrão et al., 2000; Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002; Diel et al., 2005; Mayer et al., 2006).

Após a inoculação do isolado Mutum de BoHV-5 nos coelhos, os animais foram observados várias vezes ao dia para a caracterização da sintomatologia clínica da enfermidade. Até os primeiros seis dias pós-inoculação, alguns dos animais infectados manifestaram espirros esporádicos, além de descarga nasal e ocular. Na noite do dia 6 pi, os animais do 12° dia iniciaram sinais clínicos, que se prolongaram de forma intermitente até a eutanásia dos mesmos, já previamente programada.

De uma maneira geral, os três coelhos do 12° dia apresentaram sinais clínicos caracterizados por episódios de depressão e agitação, convulsões do tipo Jackson (movimentos musculares originalmente sobre o nariz e a boca e depois espalhando-se sequencialmente para a musculatura do pescoço, membros anteriores e posteriores), nistagmo e andar em círculos. Um dos animais manifestou uma paresia dos membros pélvicos, mais acentuada no esquerdo. No dia 8 pi foi feito exame clínico do sistema locomotor deste animal e constatou-se que o membro posterior esquerdo estava mais flácido e tinha sensibilidade diminuída em relação ao

membro contra-lateral, especialmente na região dorsal. Nas tabelas a seguir são

descritos individualmente todos os sintomas manifestados pelos animais infectados.

Tabela 05. Sintomas dos coelhos do 5º dia, infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

ANIMAL	Infectado 1	Infectado 2	Infectado 3	C1
1º dia	X	X	X	X
2º dia	X	Espirros	X	X
3º dia	Descarga nasal	Espirros e descarga nasal	X	X
4º dia	X	X	X	X
5º dia	X	X	X	X

X – Ausência de sintomas.

Tabela 06. Sintomas dos coelhos do 12º dia, infectados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

ANIMAL	Infectado 4	Infectado 5	Infectado 6	C2
1º dia pi	X	X	X	X
2º dia pi	X	X	X	X
3º dia pi	X	Descarga nasal	Descarga ocular	X
4º dia pi	X	Descarga nasal	Descarga ocular	X
5º dia pi	Descarga nasal	Descarga nasal	Descarga ocular	X
6º dia pi	Intensa agitação e depressão; andar em círculos; discretos espasmos nos membros anteriores quando em decúbito lateral.	Momentos de agitação e depressão; na fase de agitação, dava pequenos saltos e tentava correr na gaiola; espasmos nos membros posteriores em decúbito lateral.	Único momento de excitação, quando deu uma volta rápida na gaiola.	X
7º dia pi	Girava em torno do seu eixo; diminuição na movimentação dos membros posteriores, especialmente o esquerdo (MPE); excitação, espirros, movimentos bruscos de flexão da cabeça.	Agitação e durante poucos segundos, corria pela gaiola, dava pequenos saltos e flexionava rapidamente a cabeça; andar em círculos, depressão, diminuição na ingestão de água e ração; urinou na área central da gaiola, sendo que normalmente só o fazia nos cantos; convulsões do tipo Jackson.	X	X
8º dia pi	MPE estava mais flácido e tinha sensibilidade diminuída em relação ao membro contra-lateral, especialmente na região dorsal; animal coçava-se com muita frequência; episódio de tremores generalizados que duraram de 10 a 15 segundos, além tremores na face (convulsões do tipo Jackson) e nistagmo.	Tremores musculares generalizados; lambia-se e coçava-se em excesso; depressão e agitação, pequenos saltos e corridas pela gaiola.	Por alguns momentos deu pequenos pulos e movimentou-se rapidamente, além de lambar-se e coçar-se excessivamente; depressão, agitação (dava pulos, coçava-se, cavava e apresentava movimentos de flexão da cabeça).	X
9º dia pi	Alternava momentos de agitação e depressão; movimentos de flexão da cabeça.	Alternância de depressão e agitação e crise de tremores.	Alternava depressão e agitação, porém de uma forma geral bem mais deprimido que os outros dois.	X
10º dia pi	Alternava momentos de agitação e depressão; movimentos de flexão da cabeça.	Alternância de depressão e agitação e crise de tremores.	Alternava depressão e agitação, porém de uma forma geral bem mais deprimido que os outros dois.	X

11º dia pi	Alternava momentos de agitação e depressão; movimentos de flexão da cabeça.	Alternância de depressão e agitação e crise de tremores.	Tremores por todo o corpo, especialmente nos olhos. Espirrou e coçou-se bastante por alguns momentos.	X
12º dia pi	Alternava momentos de agitação e depressão; movimentos de flexão da cabeça.	Alternância de depressão e agitação e crise de tremores.	Alternava depressão e agitação, porém de uma forma geral bem mais deprimido que os outros dois.	X

X – Ausência de sintomas.

A maioria dos sintomas descritos já foi observada por outros autores em infecções experimentais em coelhos com amostras de BoHV-5 pela via intranasal. O quadro inicial pode ser caracterizado por espirros, secreção nasal e rinite, logo no terceiro dia pós-inoculação (Chowdhury et al., 1997). A manifestação dos sinais clínicos de forma intermitente, com alternância entre estados de excitação e depressão, convulsões e tremores, são achados consistentemente descritos na literatura (Meyer et al., 1996; Silva et al., 1999a; Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002; Mayer et al., 2006). No caso do animal infectado 4, que apresentou uma diminuição nos movimentos dos membros posteriores no dia 7 pi, não foram encontrados dados que relatem sintoma semelhante em coelhos infectados experimentalmente com BoHV-5. Este sintoma possa ser decorrente de uma maior facilidade do isolado Mutum em atingir a medula espinhal, tendo em vista que o bovino do qual ele foi recuperado, também apresentou alterações locomotoras.

Apesar da presença de sintomas neurológicos, os mesmos foram brandos e não levaram os animais ao óbito durante o período experimental. Vários trabalhos mostraram que cerca de 84% dos animais que apresentam sintomatologia neurológica, morre em até dois dias após o início dos mesmos (Meyer et al., 1996; Silva et al., 1999a; Beltrão et al., 2000). Com relação ao dia do início do quadro clínico, nossos achados estão de acordo com o de outros autores, que afirmam que o mesmo inicia-se entre os dias 5 e 8 pi na grande maioria dos

animais infectados (Meyer et al., 1996; Silva et al., 1999a; Beltrão et al., 2000; Diel et al., 2005).

4.2 Hemograma

Apesar de existirem diversos trabalhos apresentando valores hematológicos normais de coelhos, através de determinações médias ou observações, estes podem, dependendo das circunstâncias, serem influenciadas por fatores extrínsecos ou intrínsecos. Fatores extrínsecos estão relacionados aos diferentes meios de coleta e processamento das amostras, diferenças na metodologia, equipamento e reagentes, além de variações na operação. Os intrínsecos estão ligados às diferenças impostas pelas variações biológicas dos animais, tais como raça, sexo, idade, condição nutricional e de saúde, dentre outros (Kraus et al, 1984). Com base nestas observações e considerando-se o pequeno número de amostras e impossibilidade de muitas repetições devido ao desenho experimental, será feita somente uma análise descritiva dos resultados hematológicos dos coelhos infectados com BoHV-5.

Os resultados serão apresentados em quatro tabelas e os dados colocados de forma que se possa melhor visualizar as diferenças em cada parâmetro do eritrograma e leucograma, relacionando-se os animais controle e infectados nos diferentes tempos de coleta. A apresentação dos resultados

seguirá o mesmo modelo tanto para o eritrograma quanto para o leucograma.

Inicialmente foi feita uma comparação de médias dos parâmetros hematológicos entre os dois animais controle e os seis infectados, somente nos dias 0 e 5 pi, tendo em vista que no dia 12 pi metade dos

animais já tinha sido sacrificada (Tabela 05). Na tabela 06, foram comparados os valores individuais do animal C2 com a média dos animais do 12º dia. Optou-se por essa comparação porque tanto o animal C2 quanto os infectados deste grupo, foram eutanasiados no mesmo dia, favorecendo assim a observação de possíveis alterações.

Tabela 07. Valores médios do eritrograma e avaliação de plaquetas nos dias 0 e 5 pi, dos animais controle e infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

Animais Controle								
	HEM* (x 10⁶ cél/s /µl)	HGB* (g/dl)	HCT* (%)	VCM* (fl)	CHCM* (g/dl)	HCM* (g/dl)	RDW* (%)	PLQ* (x 10³ cél/s /µl)
Dia 0								
Média	5,73	11	33,35	58	32,95	19,25	17,5	519
Desvio Padrão	0,24	0,71	0,21	2,83	1,91	2,05	2,97	12,7
Dia 5								
Média	5,635	10,95	32,25	57,5	33,9	19,55	16,65	362,5
Desvio Padrão	0,60	0,07	0,92	4,95	1,41	2,33	1,77	94,05
Animais Infectados								
Dia 0								
Média	5,95	11,53	34,17	57,83	33,77	19,52	16,10	478,33
Desvio Padrão	0,72	0,88	2,87	3,71	0,58	1,10	1,44	110,39
Dia 5								
Média	5,18	10,25	29,52	57,17	34,68	19,80	15,50	315,50
Desvio Padrão	0,79	1,46	4,19	3,06	0,57	0,93	1,26	108,92

* **HEM** – número de hemácias; **HGB** – hemoglobina; **HCT** – hematócrito; **VCM** – volume corpuscular médio; **CHCM** – concentração hemoglobínica corpuscular média; **HCM** – hemoglobina corpuscular média; **RDW** (*Red Cell Distribution Width*) – índice de variação do tamanho das hemácias; **PLQ** – plaquetas.

Tabela 08. Valores individuais do eritrograma e avaliação de plaquetas do animal controle 2 e dos animais do 12º dia, infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

Controle 2								
	HEM* (x 10⁶ cél/s /µl)	HGB* (g/dl)	HCT* (%)	VCM* (fl)	CHCM* (g/dl)	HCM* (g/dl)	RDW* (%)	PLQ* (x 10³ cél/s /µl)
Dia 0	5,56	11,5	33,5	60	34,3	20,7	15,4	510
Dia 5	5,21	11	31,6	61	34,9	21,2	15,4	296
Dia 12	5,42	11,3	32,6	61	34,5	20,9	15	300
Animais do 12º dia								
Dia 0								
Média	6,18	11,93	35,63	58,33	33,47	19,52	16,37	478,33
Desvio Padrão	0,97	1,15	3,69	4,62	0,58	1,51	2,03	82,29
Dia 5								
Média	5,57	11,03	31,63	57,33	38,83	19,93	15,40	371,67
Desvio Padrão	0,87	1,16	2,85	3,79	0,55	1,29	1,82	80,62
Dia 12								
Média	5,67	11,37	32,40	57,67	35,10	20,20	15,40	397,00
Desvio Padrão	0,69	0,76	2,21	3,21	1,15	1,68	1,37	114,64

* **HEM** – número de hemácias; **HGB** – hemoglobina; **HCT** – hematócrito; **VCM** – volume corpuscular médio; **CHCM** – concentração hemoglobínica corpuscular média; **HCM** – hemoglobina corpuscular média; **RDW** (*Red Cell Distribution Width*) – índice de variação do tamanho das hemácias; **PLQ** – plaquetas.

Os dados obtidos indicam uma tendência de queda no hematócrito no dia 5 pi em todos os animais infectados, com uma leve recuperação no dia 12 pi. Esta anemia discreta pode ter sido provocada pela coleta das amostras de sangue ou por uma condição denominada Anemia da Doença Inflamatória (ADI). A primeira hipótese é menos provável porque os animais tinham sido submetidos a apenas uma coleta, e em uma anemia hemorrágica seria esperado, juntamente com uma queda nos valores do hematócrito, uma redução do VCM e CHCM, sugerindo uma anemia regenerativa. Ao contrário disto, estes valores mantiveram-se nos mesmos patamares do dia 0 pi e em alguns casos a CHCM aumentou no dia 5 pi.

A Anemia da Doença Inflamatória é uma anemia branda a moderada, aplásica, normocítica e normocrômica, associada com processo inflamatório, infecções crônicas, condições traumáticas e doença neoplásica disseminada. Sua patogênese é multifatorial, mediada por citocinas secretadas durante a inflamação. ADI resulta da diminuição na disponibilidade de ferro, um declínio na sobrevivência dos eritrócitos e diminuição na resposta à anemia. A anemia pode instalar-se de 2 a 3 dias do início do processo inflamatório e pode provocar a redução do hematócrito em torno de 10 a 15% (Warner e Harrus, 2000).

Os resultados dos índices eritrocitários, redução do hematócrito e instalação da anemia são indicativos de AID, porém para a confirmação deste diagnóstico, o perfil sérico do ferro seria necessário.

Os coelhos possuem um volume sanguíneo total de aproximadamente 55,6ml/kg de peso vivo. A Universidade de Cornell recomenda que a retirada de sangue destes animais não ultrapasse 10% do volume total no período de uma semana e 20% durante um mês (Allen, 1994). Os animais utilizados no presente trabalho, pesavam entre 0,9 e 1,1kg e estipulou-se a retirada de 0,5ml de sangue com EDTA e 2ml sem anticoagulante, totalizando 2,5ml em cada tempo de coleta ou 7,5ml em 12 dias. Este valor estaria dentro das recomendações de menos de 20% do volume total durante um mês, porém em alguns animais a perda de sangue foi maior, decorrente da dificuldade em se fazer a hemostasia. Este fato poderia explicar a tendência de queda no número total de plaquetas tanto nos animais infectados quanto nos do grupo controle. Trombocitopenia funcional pode ocorrer nos estágios iniciais de um distúrbio hemorrágico, neste caso a retirada do sangue, quando a demanda é grande, mas a produção óssea ainda não apareceu (Kerr, 2003).

Tabela 09. Valores médios do leucograma nos dias 0 e 5 pi, dos animais controle e infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

Animais Controle											
Dia 0	LT* (cél/s/μl)	Seg* (%)	Seg* (cél/s/μl)	Lin* (%)	Lin* (cél/s/μl)	Mon* (%)	Mon* (cél/s/μl)	Eos* (%)	Eos* (cél/s/μl)	Baso* (%)	Baso* (cél/s/μl)
Média	4820	42	2035,6	50,5	2424,65	8	384,2	0	0	0	0
Desvio Padrão	98,99	22,63	1132,22	19,09	870,24	2,83	128,41	0	0	0	0
Dia 5											
Média	5670	36	2027,7	57	3245,4	6	340,2	1,5	84,3	0	0
Desvio Padrão	212,13	12,73	645,31	12,73	842,59	0,00	12,73	0,71	36,91	0	0
Animais Infectados											
Dia 0											
Média	4650	31,16	1481,47	58,83	2681,03	8	379,1	2,0	104,5	0,2	10,0
Desvio Padrão	887,40	5,95	556,15	10,74	446,08	3,41	202,4	2,2	131,7	0,4	24,5
Dia 5											
Média	5168,33	37,00	1909,45	52,17	2711,48	10,50	533,05	1,00	44,15	0,00	0,00
Desvio Padrão	1029,16	5,22	469,61	5,46	673,64	3,45	204,29	1,26	51,50	0	0

* **LT** – leucócitos totais; **Seg** – segmentados; **Lin** – linfócitos; **Mon** – monócitos; **Eos** – eosinófilos; **Baso** – basófilos.

Tabela 10. Valores individuais do leucograma do animal controle 2 e dos animais do 12º dia, infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

Controle 2											
	LT* (cél/s/μl)	Seg* (%)	Seg* (cél/s/μl)	Lin* (%)	Lin* (cél/s/μl)	Mon* (%)	Mon* (cél/s/μl)	Eos* (%)	Eos* (cél/s/μl)	Baso* (%)	Baso* (cél/s/μl)
Dia 0	4890	58	2836,2	37	1809,3	6	293,4	0	0	0	0
Dia 5	5520	45	2484	48	2649,6	6	331,2	2	110,4	0	0
Dia 12	5400	51	2754	35	1890	9	486	3	162	2	108
Animais do 12º dia											
Dia 0											
Média	4720	29,67	1397,20	63,33	2990,80	5,33	256,8	1,67	75,2	0	0
Desvio Padrão	615,79	3,51	217,42	5,13	455,39	1,53	105,87	1,15	44,19	0	0
Dia 5											
Média	5566,67	37,00	2059,83	54,67	3052,53	8,00	433,67	0,33	20,63	0	0
Desvio Padrão	880,02	6,56	521,88	5,51	635,61	2,65	114,64	0,58	35,74	0	0
Dia 12											
Média	7243,33	43,00	3104,67	44,67	3237,57	8,00	595,57	2,33	165,43	2,00	140,10
Desvio Padrão	466,94	12,29	832,56	13,65	990,89	5,20	427,50	1,15	75,90	2,65	185,90

* **LT** – leucócitos totais; **Seg** – segmentados; **Lin** – linfócitos; **Mon** – monócitos; **Eos** – eosinófilos; **Baso** – basófilos.

O leucograma dos animais infectados apresentou uma tendência à leucocitose com neutrofilia, bastante pronunciada nos animais do 12º dia. Esta neutrofilia é sugestiva de uma resposta do animal ao processo inflamatório desencadeado pela infecção experimental com BoHV-5, tendo sido claramente evidenciada nos animais sacrificados mais tardiamente e que

manifestaram sintomatologia clínica neurológica. Neutrofilia também poderia estar presente na fase inicial de regeneração das hemorragias, neste caso, como previamente discutido, devido às coletas de sangue. A liberação aumentada de eritrócitos jovens com o intuito de compensar a perda de sangue, poderia vir

acompanhada de um maior número de neutrófilos.

4.3 Soroconversão

Todos os coelhos eram negativos para anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BoHV-5 no início do experimento (dia 0). Os animais controle não apresentaram produção de anticorpos anti-BoHV-5 durante todo o período experimental, conforme esperado.

Dentre os infectados, somente os animais do 12º dia, apresentaram produção de anticorpos anti-BoHV-5 (utilizando-se a amostra padrão EVI-88). Os animais 4 e 6 alcançaram títulos de 1:128, e o animal 5 de 1:32. Estes coelhos manifestaram sintomatologia clínica neurológica a partir do dia 6 pi. Nem mesmo os animais com títulos de anticorpos para BoHV-5 apresentaram reatividade à amostra Colorado de BoHV-1.

Tabela 11. Soroconversão para a amostra Colorado de BoHV-1 e amostra padrão EVI-88 de BoHV-5 em coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

	Animais	Dia 0		Dia 5		Dia 12	
		BoHV-1	BoHV-5	BoHV-1	BoHV-5	BoHV-1	BoHV-5
	1	-	-	-	-	-	-
5º dia	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	+
12º dia	5	-	-	-	-	-	+
	6	-	-	-	-	-	+
	Controle 1	-	-	-	-	-	-
	Controle 2	-	-	-	-	-	-

Os dados obtidos estão de acordo com outros trabalhos de infecção experimental com BoHV-5. Em observações pontuais, coelhos infectados experimentalmente soroconverteram nos dias 21 (Meyer et al., 1996) e 30 pi (Caron et al., 2002). Perez et al. (2002) ao infectarem bezerros com BoHV-5, observaram soroconversão em cerca de 16% dos animais nos dias 12 e 13 pi e 90% no dia 14 pi. Em outro experimento realizado também em bezerros, desta vez comparando a patogênese de BoHV-1 e BoHV-5, constatou-se sorologia positiva no dia 7 pi em cerca de 60% dos animais infectados com BoHV-1, enquanto que nos com BoHV-5, a soroconversão ocorreu somente a partir do dia 9 pi (Meyer, et al., 2001).

4.4 Titulação viral dos suabes nasais

O vírus Mutum foi re-isolado dos suabes nasais em “pool” dos animais do 12º dia no dia 3 pi e com maior frequência nas amostras de todos os animais infectados, nos dias 5 e 12 pi (Tabela 9). Não foi possível calcular os títulos virais em cada fragmento devido à não uniformidade nos resultados. Em algumas ocasiões, pequeno número de poços continha efeito citopático e em outras, após, por exemplo, efeito em baixa diluição, diluições maiores apresentavam dois ou três poços com ECP, inviabilizando o cálculo do título. Em alguns poços das placas, especialmente nas colunas onde as amostras testadas não sofreram diluição, observou-se a presença de efeito tóxico, caracterizado pela

separação entre as células da monocamada,

com retração e deformidade das mesmas.

Tabela 12. Titulação viral dos suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

TEMPO	AMOSTRAS	Número e % de poços com efeito citopático		
		PURO	10 ⁻¹	10 ⁻²
Dia 0	“Pool” dos suabes dos animais do 5° dia	0	0	0
Dia 0	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	0	0	0
Dia 3	“Pool” dos suabes dos animais do 5° dia	0	0	0
Dia 3	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	0	0	1 (12,5 %)
Dia 5	“Pool” dos suabes dos animais do 5° dia	7 (88 %)	1 (12,5 %)	0
Dia 5	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	8 (100 %)	8 (100 %)	0
Dia 12	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	6 (75 %)	1 (12,5 %)	0
Dia 5	Controle 2*	Não testado	0	0

* - foi escolhida aleatoriamente a amostra do animal controle 2 no dia 5 pi e testada nas diluições 10⁻¹ e 10⁻².

Os resultados obtidos com os suabes nasais apontam para uma liberação mais intensa do vírus a partir do dia 5 e ainda mantendo-se ativa nos animais do dia 12 pi. Estes achados diferem um pouco dos previamente citados na literatura consultada para coelhos infectados experimentalmente com BoHV-5, que descrevem positividade nas secreções nasais a partir do dia 1 até o dia 7 pi, e em alguns casos permanecendo até os dias 9 e 10 pi (Meyer et al., 1996; Silva et al., 1999a; Caron et al., 2002; Diel et al., 2005; Mayer et al., 2006).

No material proveniente das coletas no dia 0 pi dos animais do 12° dia (Tabela 10) e também em alguns poços de todos os animais no dia 3 pi, observou-se a presença de efeito citopático, o que não seria

esperado, uma vez que no dia 0 os animais ainda não estavam inoculados, e, ressalta-se aqui que os experimentos foram conduzidos de maneira extremamente criteriosa e em laboratório de biossegurança nível P3+. O efeito citopático presente nestas amostras diferiu do observado por nós em isolamento prévio da amostra Mutum e mesmo no reisolamento aqui descrito para os animais do 5° e 12° dias. A monocamada celular apresentava-se com vacuolizações extensas e presença de pequenos focos, às vezes no mesmo poço, onde as células se dispunham em um formato circularizado e unidirecional, como um redemoinho, sugerindo alterações nos filamentos de actina (Figuras 2.1C; D; E; F e 2.2G; H; I). Estes efeitos podem ter sido causados por outros herpesvírus que infectam coelhos.

Tabela 13. Efeito citopático provocado por agente desconhecido, observado em material proveniente de suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

TEMPO	AMOSTRAS	Número e % de poços com efeito citopático		
		PURO	10 ⁻¹	10 ⁻²
Dia 0	“Pool” dos suabes dos animais do 5° dia	0	1 (12,5 %)	0
Dia 0	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	0	8 (100 %)	8 (100 %)
Dia 3	“Pool” dos suabes dos animais do 5° dia	0	1 (12,5 %)	3 (38 %)
Dia 3	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	0	3 (38 %)	1 (12,5 %)
Dia 5	“Pool” dos suabes dos animais do 5° dia	0	0	0
Dia 5	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	0	0	0
Dia 12	“Pool” dos suabes dos animais do 12° dia	0	0	0
Dia 5	Controle 2*	Não testado	0	0

* - foi escolhida aleatoriamente a amostra do animal controle 2 no dia 5 pi e testada nas diluições 10⁻¹ e 10⁻².

Atualmente são conhecidas três espécies de herpesvírus que infectam coelhos: *Herpesvirus leporideo 1* (LeHV-1) ou *Herpesvirus dos Coelhos Cottontail*, *Herpesvirus leporideo 2* (LeHV-2) ou *Herpesvirus cuniculi*, e *Herpesvirus Leporideo 3* (LeHV-3) ou *Herpesvirus sylvilagus*. A classificação destas espécies ainda não foi completamente definida, porém há uma tentativa de enquadrá-las como membros da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus* (ICTV, 2007).

Até o momento não há citação da ocorrência de coelhos infectados com *Herpesvirus leporideos* ou com HHV-1 no Brasil. A presença de efeito citopático observado no presente trabalho, apresentando características diferentes das atribuídas aos BoHV, pode ter sido produzida por algum vírus que os animais já albergavam. Apesar da carência de pesquisas e do desconhecimento da situação das herpesvíroses em coelhos no Brasil, conjecturamos que os mesmos estavam naturalmente infectados com outra espécie de herpesvírus, que seria a responsável por estas alterações nas células infectadas com amostras provenientes de secreção nasal, e, que a infecção poderia estar na sua forma latente, agudizada pelo estresse sofrido pelos animais durante o experimento.

Infecção transplacentária experimental com HHV-1 já foi obtida (Middelkamp et al., 1967 citado por Spieker e Yuill, 1977a) e poderia ser umas das possíveis vias de infecção dos coelhos de 40 dias de idade, utilizados no nosso trabalho.

Como descrito por Nesburn (1969) o *H. cuniculi* pode estar presente em coelhos da raça Nova Zelândia sem causar nenhuma sintomatologia clínica, características estas, pertinentes aos animais utilizados no presente estudo. Outra possibilidade seria a reativação de um herpes latente nestes animais em decorrência de estresse pelo

transporte, mudança de ambiente, manipulação e inoculação experimental.

Acreditamos que o ECP observado nas amostras do dia 0 pi provenientes de suabes nasais, portanto antes da inoculação do BoHV-5, e a repetição do mesmo no dia 3 pi possa ter sido provocada por esta possível pré-infecção. Os ECP característicos de BoHV-5 foram mais frequentes nas amostras coletadas nos dias 5 e 12 pi, coincidindo com uma ausência do ECP desconhecido, observado nos primeiros dias.

Até o presente momento ainda não foram feitas tentativas de identificar o agente responsável pelos efeitos citopáticos no material proveniente de suabes nasais dos coelhos infectados com BoHV-5. A identificação e caracterização do mesmo deverão ser feitas o mais breve possível e serão de fundamental importância tanto para uma interpretação mais precisa dos nossos resultados, quanto para o aperfeiçoamento do coelho como modelo experimental. Ressalta-se ainda, a importância da caracterização destes agentes uma vez que não há relatos desta infecção no Brasil.

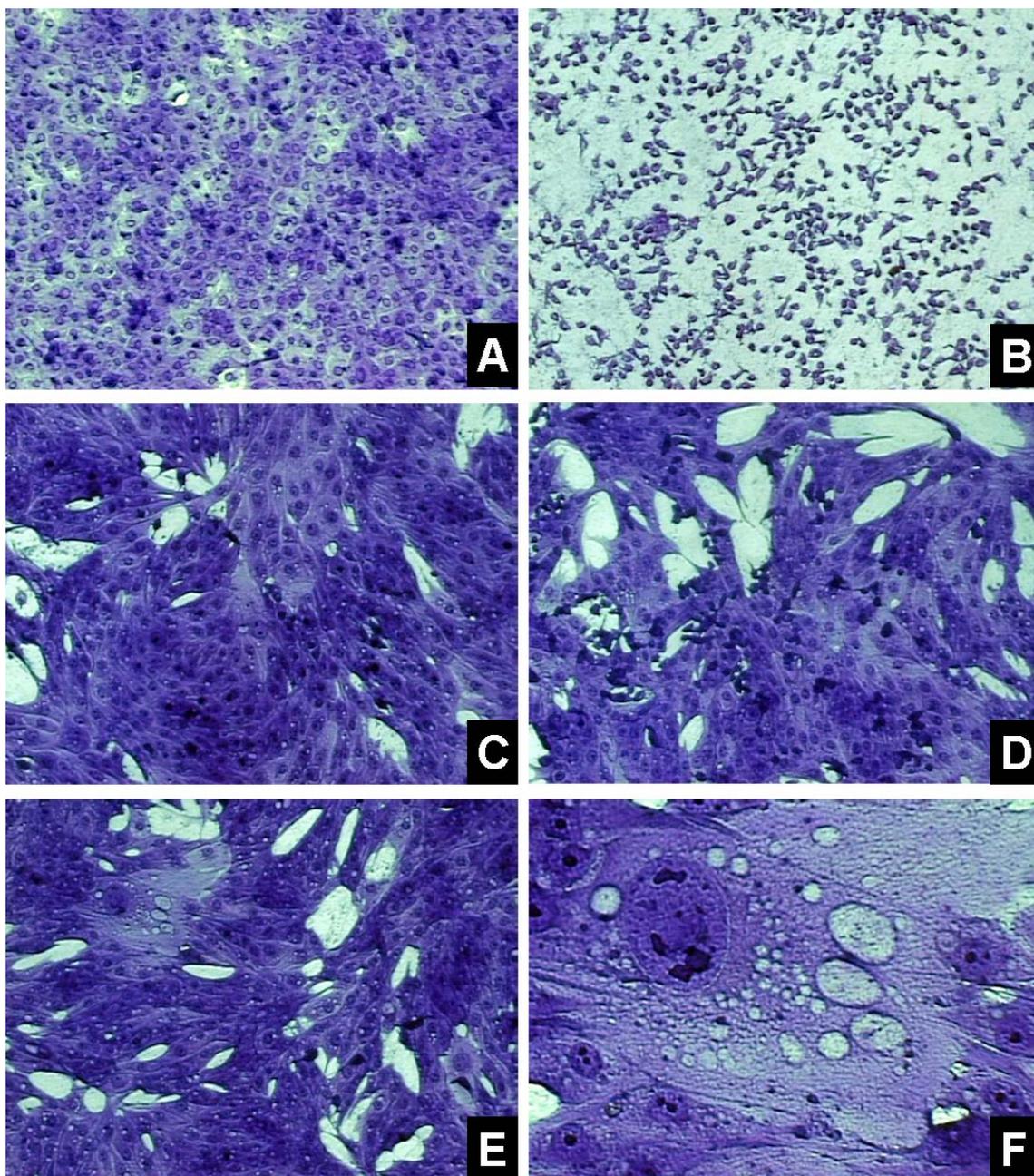


Figura 2.1: Efeito citopático observado na titulação viral em células MDBK a partir do “pool” de suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5. Após 96 horas de inoculação das amostras, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. Estas foram fotografadas em microscópio *Olympus IX-70* (Japão), Câmera *Optometrics DEI-470* (Londres – UK) e processador de imagem *Image-Pro Plus v. 4.0 media cybernetics* (UK). (A) controle celular (100 X); (B) controle positivo Mutum – ECP (100 X); (C [100 X]; D [100 X]; E [100 X]; F [400 X]) “Pool” dos animais do 12º dia (no dia 0 pi) – ECP evidenciado por vacuolização intensa e possível alteração em filamentos de actina, indicado pela indução do efeito de “redemoinho” em muitos focos de infecção na monocamada celular.

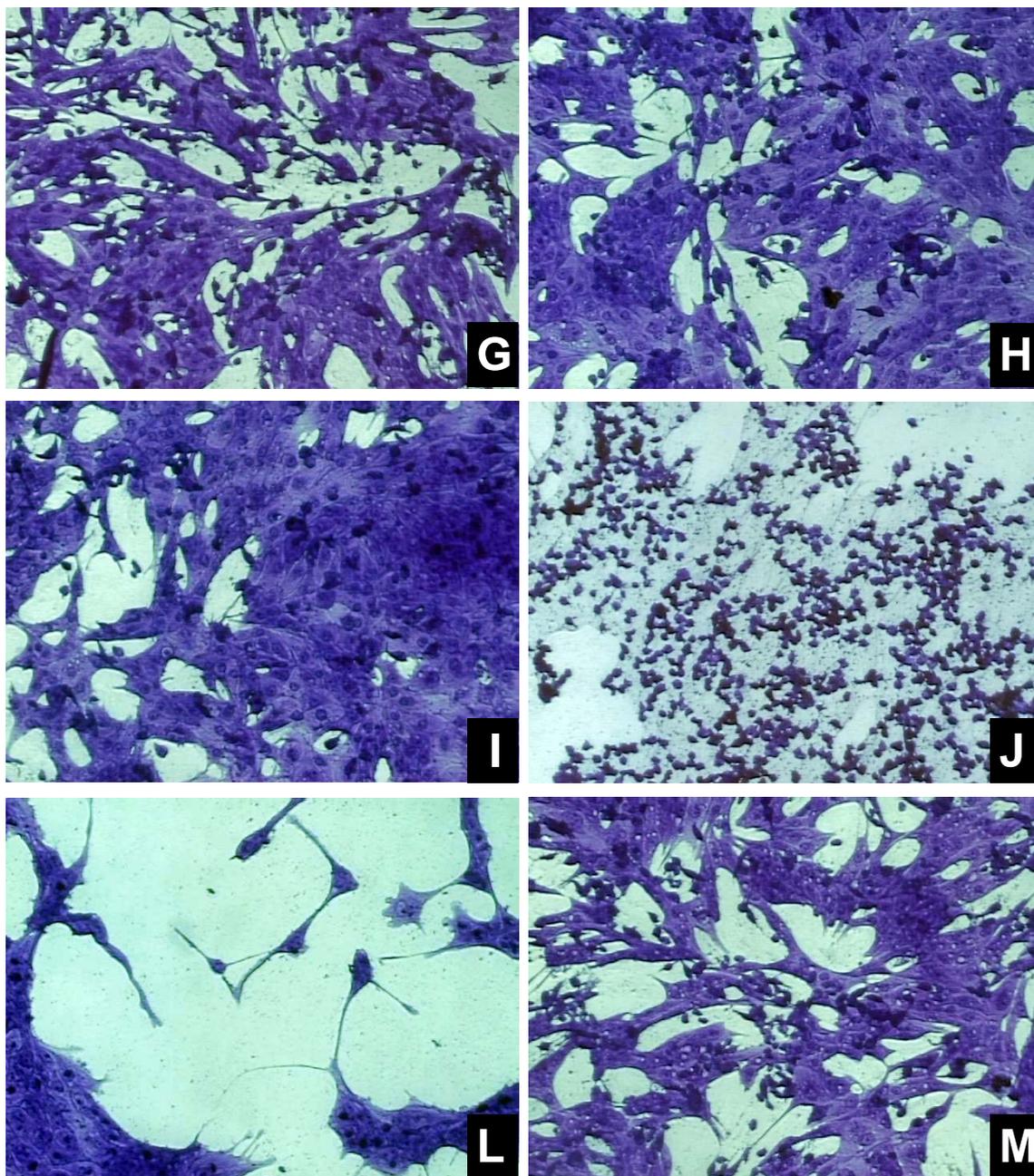


Figura 2.2: Efeito citopático observado na titulação viral em células MDBK a partir do “pool” de suabes nasais de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5. (G [100 X]; H [100 X]; I [100 X]) “Pool” dos animais do 12º dia (no dia 0 pi) – ECP evidenciado por vacuolização intensa e possível alteração em filamentos de actina, indicado pela indução do efeito de “redemoinho” em muitos focos de infecção na monocamada celular; (J) “Pool” dos animais do 12º dia (no dia 3 pi) – ECP de BoHV-5 [40 X]; (L [100 X]; M [100 X]) “Pool” dos animais do 12º dia (no dia 5 pi) – ECP de BoHV-5.

4.5 Titulação viral dos tecidos

O vírus foi re-isolado em culturas celulares de MDBK, a partir de fragmentos de córtex cerebral, cerebelo, gânglio trigeminal e medula cervical, como já relatado na literatura, e, a partir de fragmentos de medula torácica e medula lombar, o que é aqui relatado pioneiramente. Algumas das amostras positivas eram oriundas de animais do 5º dia e outras de animais 12º dia. Neste caso também não foi possível

calcular os títulos virais em cada fragmento devido à mesma desuniformidade relatada anteriormente para o “pool” dos suabes nasais. Em alguns poços, observou-se a presença de efeito tóxico bastante semelhante ao descrito na titulação dos suabes. A tabela 14 detalha as áreas, os animais e as diluições em que foram observados ECP em células MDBK inoculadas com sobrenadante do macerado de tecidos dos coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5.

Tabela 14. Titulação viral dos tecidos macerados provenientes de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5, Belo Horizonte, 2008.

AMOSTRAS	Número e % de poços com efeito citopático nas diluições testadas					
	Animais do 5º dia			Animais do 12º dia		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Córtex	4 (50 %)	0	2 (25 %)	0	0	0
Cerebelo	1 (12,5 %)	0	0	1 (12,5 %)	0	0
Tronco encefálico	0	0	0	0	0	0
Gânglio trigêmeo	1 (12,5 %)	0	2 (25 %)	0	0	0
Medula cervical	2 (25 %)	0	0	0	0	0
Medula torácica	0	0	0	0	2 (25 %)	0
Medula lombar	0	1 (12,5 %)	0	0	0	0
Gânglio trig. C2*	0	NT	NT	NT	NT	NT
Medula lombar C2*	NT	NT	NT	0	NT	NT

NT – não testado; * - foram aleatoriamente escolhidos dois fragmentos do animal controle 2 e testados na diluição 10⁻¹.

Como observado acima, houve replicação viral em fragmentos de córtex cerebral, cerebelo, gânglio trigeminal, medula cervical e medula lombar já no 5º dia pi. Apesar da não observação de ECP na medula torácica neste tempo, é provável que a mesma também estivesse positiva, considerando-se que a secção seguinte, a medula lombar, apresentou positividade. Nos animais do 12º dia, o vírus foi re-isolado somente do cerebelo e da medula torácica.

Baseando-se no fato de que a principal via de acesso do BoHV-5 ao SNC seja a via olfatória e que a reprodução experimental da enfermidade por via intranasal, tanto em coelhos quanto em bezerras seja bem sucedida, o encéfalo tem sido a principal região escolhida para re-isolamento deste

vírus. Em vários trabalhos utilizando-se coelhos como modelo experimental, são feitos mapeamentos ou tentativas de re-isolamento viral apenas no encéfalo (Meyer et al., 1996; Beltrão et al., 2000; Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002), no encéfalo e gânglio trigeminal (Chowdhury et al., 1997; Mayer et al., 2006) ou encéfalo e medula cervical (Silva et al., 1999a).

Devido à manifestação clínica apresentada pelo bovino do qual o isolado Mutum de BoHV-5 foi recuperado, e que caracterizou-se inicialmente como síndrome medular, hipotetizou-se a possibilidade de a medula espinhal ser um material adequado para re-isolamento de BoHV-5. Desta maneira, fragmentos de várias porções da medula foram devidamente coletados para processamento virológico. A presença de

efeito citopático em porções de medula cervical, torácica e lombar é um achado extremamente importante e ressalta a necessidade de que estas áreas sejam consideradas em futuras experimentações animais e possivelmente também, como material para encaminhamento laboratorial em suspeitas de casos naturais de meningoencefalite por BoHV-5.

Este achado pode ser o ponto de partida para o entendimento da patogênese do BoHV-5, especialmente no tocante aos quadros clínicos que envolvem não somente meningoencefalite não supurativa e quadros respiratórios, mas também a eliminação do vírus em sêmen de animais infectados e saudáveis (Gomes et al., 2003; Esteves et al., 2003; Silva et al., 2007b).

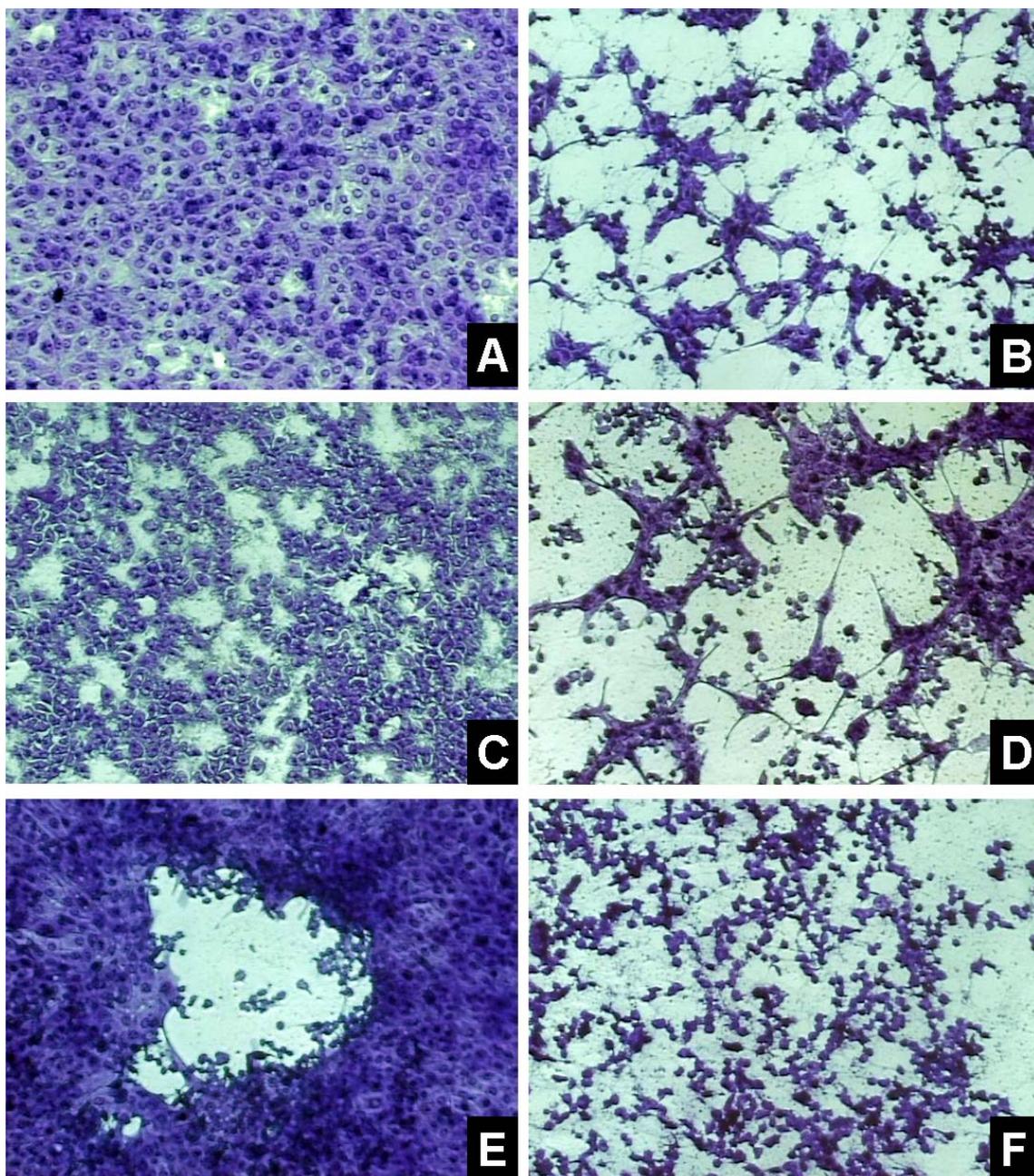


Figura 3: Efeito citopático observado na titulação viral em células MDBK a partir de diversos fragmentos de tecidos de coelhos infectados com o isolado Mutum de BoHV-5. Após 96 horas de inoculação das amostras, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. Estas foram fotografadas em microscópio *Olympus IX-70* (Japão), Câmera *Optometrics DEI-470* (Londres – UK) e processador de imagem *Image-Pro Plus v. 4.0 media cybernetics* (UK). **(A)** controle celular (100 X); **(B)** controle positivo Mutum – ECP (100 X); **(C)** Efeito tóxico caracterizado por separação entre as células, retração e deformidade das mesmas, observado em material proveniente da medula lombar dos animais do 5º dia (100 X); **(D)** córtex cerebral dos animais do 5º dia – ECP (100 X); **(E)** gânglio trigeminal dos animais do 5º dia – ECP (100 X); **(F)** medula cervical dos animais do 5º dia – ECP (100 X).

4.6 Achados de necropsia e histopatológicos

Não foram observadas alterações macroscópicas em nenhum dos animais experimentais. O exame histológico revelou que o animal infectado 6 (12º dia) apresentou áreas de discreta meningite focal com leve hiperemia e edema, acompanhado de infiltração inflamatória mononuclear no córtex cerebral. Nas demais áreas do sistema nervoso os tecidos apresentavam-se sem alterações.

A recuperação de BoHV-1 de leucócitos de bovinos inoculados experimentalmente pela via intranasal (McKercher et al., 1970) ou intracerebral (Hall et al., 1966) e de rins de bezerros inoculados via intranasal (Meyer et al., 2001) demonstrou que em alguns casos os animais podem desenvolver uma fase virêmica, e que o vírus poderia ter acesso ao SNC por via hematogênica. Esta possibilidade nos motivou a coletar diversos fragmentos de órgãos além do SNC. Não foram evidenciadas lesões histológicas em secções de coração, pulmões, rins, baço, fígado e pâncreas.

A ausência de achados macroscópicos (Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a; Caron et al., 2002) ou presença apenas de alterações inespecíficas (Meyer et al., 1996), são predominantes em casos de infecção experimental de coelhos com BoHV-5. Já na experimentação com bezerros, tanto pode haver ausência de lesões (Vogel et al., 2003; Meyer et al., 2001), como presença de amolecimento do parênquima cerebral, hemorragia focal nas meninges e região frontal do cérebro, além de hemorragia extensiva na ponte e no lobo parietal esquerdo (Perez et al., 2002).

Embora alguns autores, ao infectar coelhos com amostras de BoHV-5, tenham observado diversas alterações histológicas como meningoencefalite não-supurativa difusa, com degeneração neuronal,

manguitos perivasculares e focos de gliose (Meyer et al., 1996; Chowdhury et al., 1997), estes achados não estão presentes em todos os casos. Silva et al (1999a) ao analisarem histologicamente diversas áreas do SNC de 20 coelhos infectados experimentalmente com BoHV-5, que morreram ou foram eutanasiados após manifestação de sintomatologia neurológica, observaram que 40% deles não tinha nenhuma alteração e que 55% apresentavam apenas lesões brandas, como focos de meningite não-supurativa e gliose. Os autores sugerem que esta diferença pode estar relacionada a uma massiva invasão viral e replicação no SNC, levando os animais à morte antes que significativa resposta inflamatória possa ter sido ativada.

A ausência de lesões nos animais do 5º dia poderia ser de certa forma justificada pelo fato de que os animais neste período não tinham apresentado sintomatologia clínica neurológica. A baixa intensidade das lesões observadas no SNC dos animais do 12º dia, está em consonância com os sintomas apresentados, que foram brandos e não levaram nenhum animal à morte durante o período estudado. A amostra Mutum de BoHV-5 utilizada neste trabalho, foi inoculada experimentalmente pela primeira vez, e desta maneira ainda são desconhecidos os fatores que por ventura sejam inerentes à mesma e que possam influenciar nas características clínico-patológicas dos animais infectados. Até mesmo amostras testadas, como o isolado argentino A663, que já tinha sido utilizado com sucesso em infecção experimental em bezerros e coelhos (Schudel et al., 1986; Meyer et al., 1996), falhou em provocar enfermidade quando inoculado novamente em coelhos (Silva et al., 1999a). Esses dados sugerem a existência de inúmeros fatores desconhecidos e possivelmente ligados aos animais e aos isolados virais, que podem interferir nos resultados esperados.

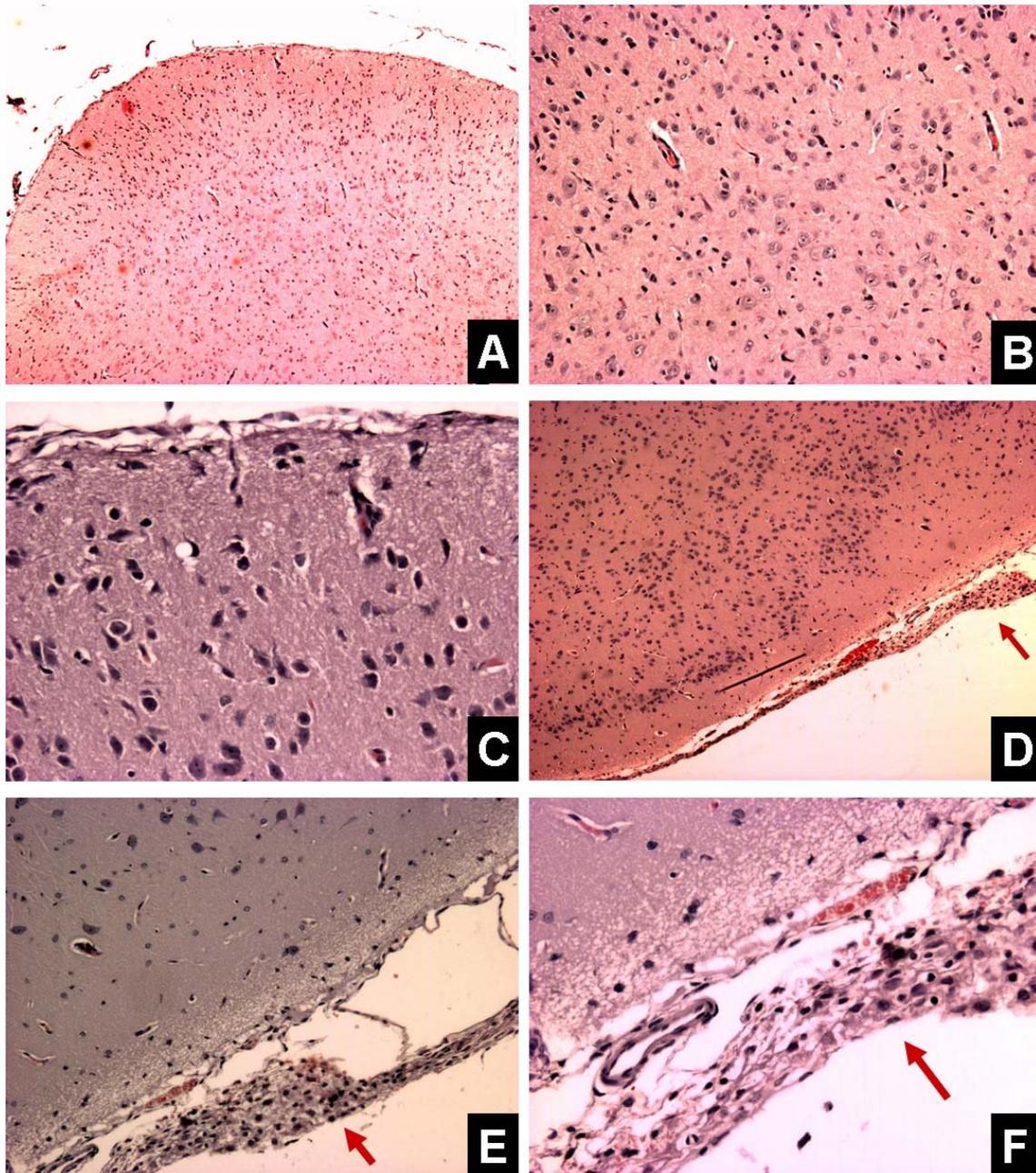


Figura 4.1: Cortes histológicos de sistema nervoso de coelhos experimentalmente infectados com a amostra Mutum de BoHV-5. Após processamento histológico as lâminas foram coradas com H&E e fotografadas em microscópio *Olympus IX-70* (Japão), Câmera *Optometrics DEI-470* (Londres – UK) e processador de imagem *Image-Pro Plus v. 4.0 media cybernetics* (UK). (A [40 X]; B [100 X]; C [400 X]) – córtex cerebral do animal controle 1; (D [40 X]; E [100 X]; F [400 X]) - córtex cerebral do animal infectado 6: área de discreta meningite focal, acompanhada de infiltração inflamatória mononuclear (setas).

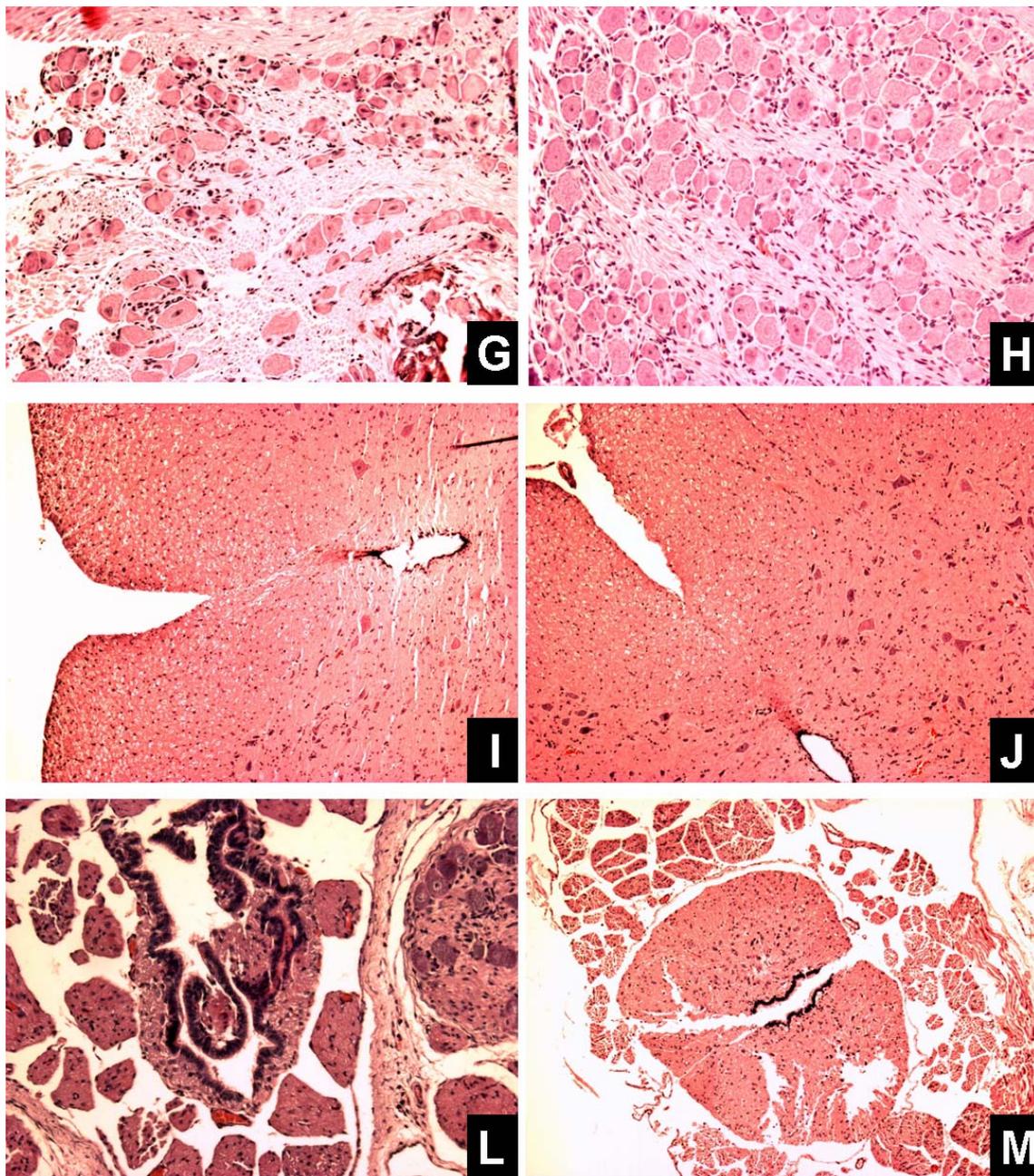


Figura 4.2: Cortes histológicos de sistema nervoso de coelhos experimentalmente infectados com a amostra Mutum de BoHV-5. **G** – gânglio trigeminal do animal controle 1 (100 X); **H** - gânglio trigeminal do animal infectado 4 (100 X); **I** – medula cervical do animal controle 1 (40 X); **J** - medula cervical do animal infectado 4 (40 X); **L** – medula sacral do animal controle 2 (100 X); **M** - medula sacral do animal infectado 4 (40 X).

4.7 Reação de polimerase em Cadeia (PCR)

O BoHV-5 foi detectado nos fragmentos de medula cervical e torácica dos animais do 5º dia, além do cerebelo, tronco encefálico, medula cervical e medula torácica dos animais do 12º dia (Tabela 12). As amostras de medula cervical (5º dia), tronco encefálico (12º dia) e medula torácica amplificaram em ambos os sistemas de

PCR utilizados. Já o cerebelo e medula cervical dos animais do 12º dia, só amplificaram na PCR que gerou produto interno de 222 pb. Todas as amostras de suabes nasais foram negativas nos dois sistemas utilizados, o que enfatiza a diferença observada no efeito citopático e a discussão de que o mesmo seria um vírus totalmente distinto do inoculado nos animais.

Tabela 15. Fragmentos de tecidos dos coelhos inoculados experimentalmente com o isolado Mutum de BoHV-5, onde detectou-se o vírus utilizando-se dois sistemas de PCR, Belo Horizonte, 2008.

Amostras	Sistemas de PCR – região gênica parcial codificadora da gG	
	Produto final de 515 pb	Produto final de 222 pb
	pb	pb
Medula cervical dos animais do 5º dia	+	+
Medula torácica dos animais do 5º dia	+	+
Cerebelo dos animais do 12º dia	-	+
Tronco encefálico dos animais do 12º dia	+	+
Medula cervical dos animais do 12º dia	-	+
Medula torácica dos animais do 12º dia	+	+

Na tabela 15, pode-se observar que as amostras de cerebelo e medula cervical dos animais do 12º dia, amplificaram somente na PCR que gerou produto final de 222pb. Segundo Forghani e Erdman (1995), um produto pequeno de amplificação secundária na PCR *nested* gera uma maior sensibilidade, por minimizar a amplificação de sítios secundários. Isto justificaria a positividade dos quatro fragmentos no sistema de 515pb e a repetição dos mesmos no de 222pb, sendo que este último ainda possibilitou a detecção do vírus em mais dois fragmentos, por ser um sistema mais sensível.

A associação entre os resultados obtidos no re-isolamento e PCR das amostras de medula dos coelhos infectados, nos permite fazer algumas considerações. Os

fragmentos de medula cervical dos animais do 5º dia e medula torácica dos animais do 12º dia foram positivos em todos os testes, indicando não só a presença do vírus nestas áreas, mas também uma replicação ativa. Já a amostra de medula cervical dos animais do 12º dia, foi positiva somente na PCR que gerou produto final de 222pb, sugerindo que possivelmente havia uma quantidade menor de vírus nesta área, que não foi capaz de produzir ECP. Outro fato interessante foi a presença de ECP em um poço inoculado com a amostra de medula lombar dos animais do 5º dia, porém a negatividade do mesmo nos dois sistemas de PCR. Interpretamos este achado como uma possibilidade, de ter havido somente um início de replicação viral neste local, talvez com a sua evolução comprometida pela eutanásia dos animais.

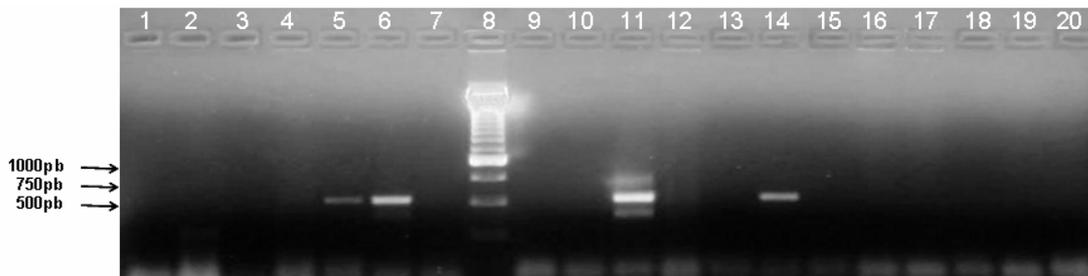


Figura 5: PCR semi-nested de DNA extraído do sobrenadante dos macerados de tecidos e suabes nasais – 515pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio. Canaletas: **1** – córtex; **2** – cerebelo; **3** – tronco encefálico; **4** – gânglio trigeminal; **5** – medula cervical; **6** – medula torácica; **7** – medula lombar (animais do grupo A); **8** – padrão de tamanho molecular de 250 pb Ladder (Invitrogen, Brasil); **9** – córtex; **10** – cerebelo; **11** – tronco encefálico; **12** – gânglio trigeminal; **13** – medula cervical; **14** – medula torácica; **15** – medula lombar (animais do grupo B); **16** – córtex animal controle dia 5 pi; **17** – córtex animal controle dia 12 pi; **18** - “Pool” suabe nasal dos animais do grupo A no dia 0 pi; **19** - “Pool” suabe nasal dos animais do grupo A no dia 3 pi; **20** - “Pool” suabe nasal dos animais do grupo A no dia 5 pi.

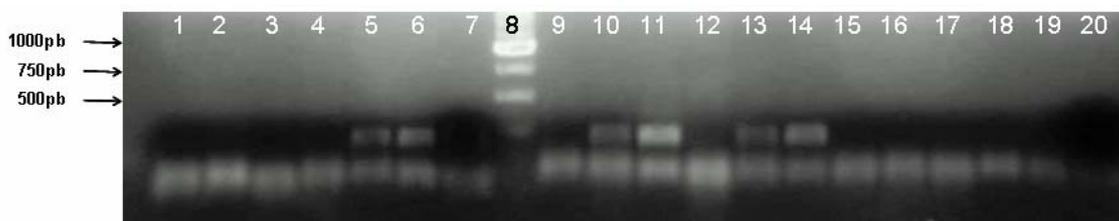


Figura 6: PCR nested com amostra de DNA extraído do sobrenadante dos macerados de tecidos e suabes nasais - 222 pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio. Canaletas: **1** – córtex; **2** – cerebelo; **3** – tronco encefálico; **4** – gânglio trigeminal; **5** – medula cervical; **6** – medula torácica; **7** – medula lombar (animais do grupo A); **8** – padrão de tamanho molecular de 250 pb Ladder (Invitrogen, Brasil); **9** – córtex; **10** – cerebelo; **11** – tronco encefálico; **12** – gânglio trigeminal; **13** – medula cervical; **14** – medula torácica; **15** – medula lombar (animais do grupo B); **16** – córtex animal controle dia 5 pi; **17** – córtex animal controle dia 12 pi; **18** - “Pool” suabe nasal dos animais do grupo A no dia 0 pi; **19** - “Pool” suabe nasal dos animais do grupo A no dia 3 pi; **20** - “Pool” suabe nasal dos animais do grupo A no dia 5 pi.

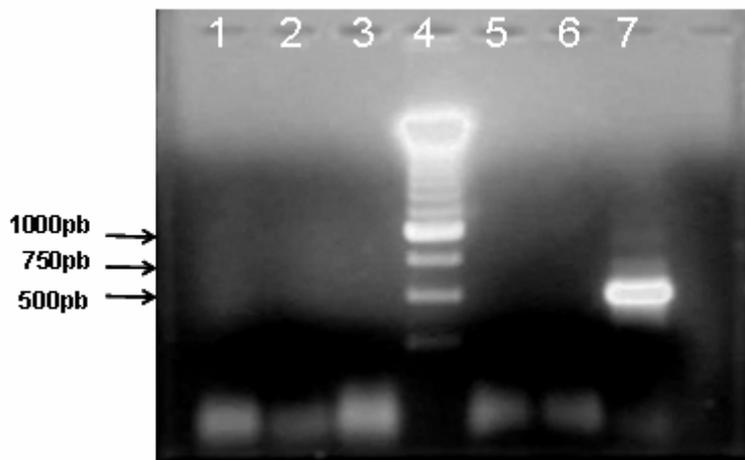


Figura 7: PCR semi-nested de DNA extraído do sobrenadante dos suabes nasais - 515 pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio. Canaletas: 1 – “Pool” dos animais do grupo B no dia 0 pi; 2 – controle negativo; 3 – “Pool” dos animais grupo B no dia 3 pi; 4 – padrão de tamanho molecular de 250 pb Ladder (Invitrogen, Brasil); 5 – “Pool” dos animais grupo B no dia 5 pi; 6 – “Pool” dos animais grupo B no dia 12 pi; 7 – controle positivo (amostra EVI-88 / BoHV-5).

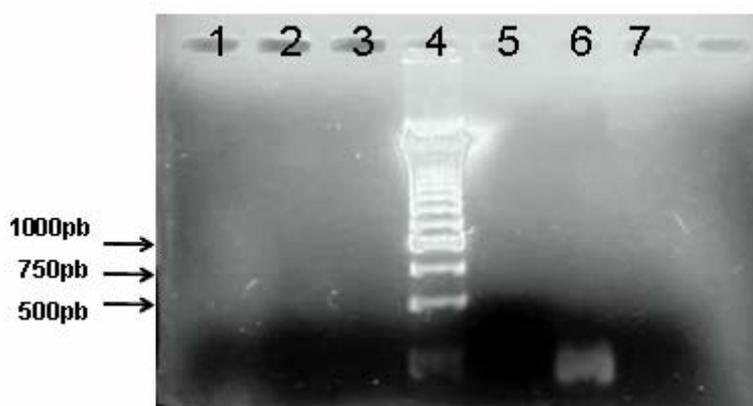


Figura 8: PCR nested de DNA extraído do sobrenadante dos suabes nasais - 222 pb. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio. Canaletas: 1 – “Pool” dos animais do grupo B no dia 0 pi; 2 – controle negativo; 3 – “Pool” dos animais do grupo B no dia 3 pi; 4 – padrão de tamanho molecular de 250 pb Ladder (Invitrogen, Brasil); 5 – “Pool” dos animais do grupo B no dia 5 pi; 6 – “controle positivo (amostra EVI-88 de BoHV-5); 7 – “Pool” dos animais do grupo B no dia 12 pi.

O re-isolamento da amostra Mutum de BoHV-5 a partir da medula espinhal de coelhos experimentalmente infectados, veio comprovar nossa suspeita de que o vírus pudesse atingir a medula, considerando-se principalmente os sintomas manifestados pelo bovino infectado naturalmente, da qual a mesma foi isolada. Questões relacionadas à patogenia dos BoHV-5 ainda não estão completamente esclarecidas, embora seja aceito que o principal acesso do vírus ao SNC seja pelas fibras nervosas distribuídas na mucosa nasal (Mckercher et al., 1970) através de transporte intra-axonal retrógrado em células nervosas locais (Engels e Ackermann, 1996), principalmente do bulbo olfatório e nervo trigêmeo (Beltrão et al., 2000; Meyer et al., 2001; Caron et al., 2002), a identificação do vírus em amostras de sêmen (Gomes et al., 2003; Esteves et al., 2003; Silva et al., 2007) e outros locais como trato respiratório, fígado, medula óssea (Schudel et al., 1986), tonsilas, linfonodos bronquiais (Belknap et al., 1994) e rins (Meyer et al., 2001), sugerem que outras vias sejam utilizadas.

Em experimento conduzido no Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares do ICB – UFMG, Alves et al. (2007) demonstraram que cinco amostras de BoHV-5, isoladas de sêmen ou do SNC de animais com sintomatologia neurológica, foram capazes de infectar macrófagos murinos (C57BL6) e que possivelmente, estes possam desempenhar um papel na disseminação do vírus no hospedeiro. Dentre as amostras trabalhadas, uma foi a Mutum, utilizada para inocular os coelhos. A amostra Mutum foi a que induziu menor efeito citopático nos macrófagos, e, apresentou teste de viabilidade mais comparável ao controle, embora a detecção do genoma tenha sido feito por PCR, atestando a infecção dos macrófagos. Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata e totalmente independentes, tendo apresentado sempre os mesmos

resultados. Existe a possibilidade deste vírus produzir alguma molécula que subverta o sistema de apoptose e facilite a utilização dos macrófagos como célula disseminadora para atingir outros sítios.

Até o momento, desconhece-se a existência de trabalhos previamente realizados que tenham re-isolado e detectado vírus através de PCR em fragmentos de medula cervical e torácica, em animais natural ou experimentalmente infectados com BoHV-5. Questiona-se se isto seria decorrente do isolado Mutum ou do fato de que em razão do desconhecimento da importância da medula espinhal como material adequado para diagnóstico virológico, o mesmo estaria sendo de certa forma negligenciado nas pesquisas e diagnóstico de meningoencefalite por BoHV-5. Dentre os principais trabalhos de infecção experimental em coelhos com BoHV-5, somente Silva et al. (1999a) tentaram re-isolar vírus em segmento de medula cervical, com a obtenção de baixos títulos.

O córtex cerebral é o principal local onde é tentado o re-isolamento de BoHV-5 em animais infectados (Meyer et al., 1996; Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a; Beltrão et al., 2000) e muitas vezes é feito um mapeamento das áreas do encéfalo que apresentam maiores títulos virais. O gânglio trigeminal também é uma região bastante pesquisada (Chowdhury et al., 1997; Mayer et al., 2006) em razão de ser considerada importante na latência e acesso do vírus ao SNC. Não foi detectado por PCR BoHV-5 em nenhum destes dois fragmentos, embora o re-isolamento viral em células MDBK tenha sido positivo. Com relação ao córtex, os fragmentos foram coletados de forma aleatória e não privilegiaram uma área específica, podendo este fato, contribuir para a negatividade das amostras. A ausência de detecção viral no gânglio trigeminal indica que possivelmente a infecção via neurônios bipolares do sistema olfatório, que projetam-se ao bulbo

olfatório, foi mais importante que a via trigeminal. Resultados obtidos por Beltrão et al. (2000) e Diel et al. (2005) revelaram que a via olfatória é mais eficiente e mais rápida na infecção experimental de coelhos com BoHV-5.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos reafirmaram a condição do coelho como modelo experimental adequado para infecção como BoHV-5 através da inoculação intranasal, porém realça a necessidade da realização de testes de triagem nos animais que serão utilizados no experimento, tendo em vista o achado descrito neste trabalho, de uma possível infecção prévia com outro vírus.

O isolado Mutum foi capaz de reproduzir doença neurológica em coelhos, manifestada por um quadro clínico brando, com episódios de excitação e depressão, convulsões e diminuição na movimentação dos membros posteriores, sinal este não observado anteriormente. As alterações histológicas foram discretas na maioria dos animais infectados.

O vírus foi re-isolado já no 5º dia pi em fragmentos de córtex cerebral, cerebelo, gânglio trigeminal, medula cervical e medula lombar. Os sistemas de PCR utilizados detectaram DNA viral na medula cervical e torácica dos animais em ambos os tempos de eutanásia, além do cerebelo e tronco dos coelhos no 12º dia pós-inoculação.

A detecção por PCR do isolado Mutum de BoHV-5 em fragmentos de medula cervical e torácica, e o re-isolamento viral à partir de fragmentos de medula cervical, torácica e lombar, sugere que o isolado estudado apresenta um neurotropismo distinto do previamente descrito para o vírus.

O isolado Mutum de BoHV-5 infecta a medula de coelhos e provoca sinais clínicos relacionados a síndrome medular. A medula espinhal é um material adequado para diagnóstico laboratorial de meningoencefalite por BoHV-5.

Estudos posteriores com o isolado Mutum na espécie bovina, deverão ser realizados no intuito de confirmar alguns dos resultados obtidos neste trabalho, bem como esclarecer algo mais sobre esta ainda intrigante patogênese do BoHV-5.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, D.A.F.; ORTEGA, L.S.; REDONDO, R.A.F. et al. Characterization on field bovine herpesvirus samples using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Virol. Methods*, v. 140, p. 200-205, 2007.

ALEGRE, M.; NANNI, M; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of herpesvirus bovine 1 and 5. *J. Vet. Med. B*, v. 48, p. 613-621, 2001.

ALLEN, P.C. Laboratory animal care and use. In: MALIK, V.S.; LILLEHOJ, E.P. *Antibody techniques*. San Diego: Academic, 1994. Cap. 5, 115-136.

ALMEIDA, R.S.; MELO, S.V.; SILVA, T.C. et al., Anticorpos monoclonais contra o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). *Pesqui. Agropecu. Gaúcha*, v. 4, p. 67-72, 1998.

- ALVES, L.C.; LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; PALHARES, R.M. et al. Replication of Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) in murine peritoneal macrophages: comparison of cell viability after infection with virus samples isolated from central nervous system and semen. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 28., 2007, Búzios: *Anais...* Búzios, 2007.
- AQUINO NETO, H. M. *Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5 - relato de caso.* 2005. 30f. Monografia (Especialização em Residência Médico-Veterinária nível 1) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B. et al. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p. 387-394, 1997.
- BAGDADI, V.M.; MARTIN, J. Ueber das vorkommen von meningoencephalitis im verlaufe von IBR – infektionen bei kaelbern und jungrindern. *Mh. Vet. Med.*, v. 28, p. 253-257, 1974.
- BARENFUS, M.; DELLIQUADRI, C.A.; McINTYRE, R.W. et al. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningo-encephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 143, p. 725-728, 1963.
- BARROS, C.S.L. *Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central dos bovinos.* Brasília: MAPA/DAS/DDA, 2003. 50p.
- BARTHA, A.; HADJU, G.; AIDASY, P. et al. Occurrence of encephalitis caused by infectious rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet. Hung.*, v. 19, p. 145-151, 1969.
- BAGUST, T.J. Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.*, v. 82, p. 365-374, 1972.
- BAGUST, T.J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.*, v. 82, p. 375-383, 1972.
- BECK, B.E. Infectious bovine rhinotracheitis encephalomyelitis in cattle and its differential diagnosis. *Can. Vet. J.*, v. 16, p. 269-271, 1975.
- BELÁK, K.; KUCSERA, L.; ROS, C. et al. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 22, p. 207-220, 1999.
- BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K. et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus 1.3. *Vet. Pathol.*, v. 31, p. 358-365, 1994.
- BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. et al. Infecção e enfermidade neurological por herpesvírus bovino 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 20, p. 144-150, 2000.

- BOTELHO, R.G.A. *Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos*. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BROWN, G.A.; FIELD, H.J. A reliable method for establishing viral infection in the rabbit by intranasal inoculation. *J. Virol. Methods*, v. 27, p. 341-346, 1990.
- CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.*, v. 84, p. 285-295, 2002.
- CARRILLO, B.J.; AMBROGÍ, A.; SCHUDEL, A.A. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zbl. Vet. med. B*, v. 30, p. 327-332, 1983a.
- CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine virus necrotizing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. med. B*, v. 30, p. 161-168, 1983b.
- CASCIO, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C. et al. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with herpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 11, p. 134-139, 1999.
- CHOWDHURY, S. I.; LEE, B. J.; MOSIER, B. J. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.*, v. 117, p. 295-310, 1997.
- CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 5 e meningoencefalite herpética bovina. *Semina: Ciências. Agrárias*, v. 23, n. 1, p. 131-141, 2002.
- CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V. et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods*, v. 128, p. 183-188, 2005.
- COLODEL, M.E.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado do Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, v. 32, p. 293-298, 2002.
- D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibodies analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet. Microbiol.*, v. 88, p. 315-324, 2002.
- D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, p. 534-539, 1993.
- D'OFFAY, J.M.; ELY R.W.; BALDWIN C.A. et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen

- in formalin-fixed bovine brain tissues. *J. Vet. Diag. Invest.*, v. 7, p. 247-251, 1995.
- DAVID, N.; HÜBNER S.O.; RIET-CORREA, F. et al. Reactivation of latent bovine herpesvirus type 5 in cattle with polyencephalomalacia induced by ammonium sulphate. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 27, n. 10, p. 435-441, 2007.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.I. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, p. 327-334, 2006.
- DE PAULA, R.R.; SOUZA, M.A.; COLODEL, E.M. et al. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, supl. 1, p. 2, 2005.
- DIAS, L.E.; MAISONNAVE, J.; GUARINO, H.; et al. Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) descripción de caso clínico em terneros de tambo. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINARIA, 3., 1982, Montevideo, Uruguay. *Anais...* Montevideo: Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, 1982. p. 521-530.
- DIEL, D.G.; FONSECA, E.T.; SOUZA, S.F. et al. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 25, p. 164-170, 2005.
- DIEL, D.G.; ALMEIDA, S.R.; BRUM, M.C.S. et al. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.*, v. 121, p. 257-267, 2007.
- ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por Herpesvírus bovino – 5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 24, p. 123-131, 2004.
- ELY, R.W.; D'OFFAY J.M.; RUEFER, A.H. et al. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 8, p. 487-492, 1996.
- EUGSTER, A.K.; ANGULOS, A.B.; JONES, L.P. Herpesvirus encephalitis in rang calves. *Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, v. 17, p. 267-290, 1977.
- ENGELS, M.; GIULIANI, G.; WILD, P. et al. The genome of bovine herpesvírus 1 (BoHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to know BoHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.*, v. 6, p. 57-73, 1986.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infection. *Vet. Microbiol.*, v. 53, p. 3-15, 1996.
- ESTEVEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C. et al. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet. Rec.*, v. 152, n. 21, p. 658-659, 2003.

FACURY, E.J. *Indução experimental de enterotoxemia pelo Clostridium Perfringens tipo D em bovinos*. 2004. 145f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A. et al. *Veterinary virology*. 2. ed. San Diego: Academic, 1993. 666p.

FLORES, E.F.; SILVA, A.M.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5): avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL – HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria, RS. *Anais...* Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1998. p. 89-96.

FORGHANI, B.; ERDMEM, D.D. Amplification and detection of viral nucleic acids. In: SCHMIDT, N.J. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. Washington: American Public Health Association, 1995. p. 97-120.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust. Vet. J.*, v. 38, p. 216-221, 1962a.

FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with meningoencephalitis. *Aust. Vet. J.*, v. 38, p. 555-556, 1962b.

FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M. et al. Bovine herpesvirus

meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol.*, v. 90, p. 565-571, 1995.

GARDINER, M.R.; NAIM, M.E.; SIER, M. Viral meningoencephalitis of calves in Western Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 40, p. 225-228, 1964.

GEORGE, L.W. Understanding the encephalitic form of infectious bovine-rhinotracheitis. *Vet. Med.*, v. 86, n. 3, p. 335-337, 1991.

GOMES, L.I. *Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) em amostras de sêmen e sistema nervoso central de bovinos: diagnóstico baseado na amplificação do gene US4*. 2001. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A. et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos no sudeste brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, n. 2, p. 217-220, 2002.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G. et al. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet. Res. Commun.*, v. 27, n. 6, p. 495-504, 2003.

GOUGH, A.; JAMES, D. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis. *Can. Vet. J.*, v. 16, p. 313-314, 1975.

- GOULD, D.H. Polioencephalomalacia. *J. Anim. Sci.*, v. 76, p. 309-314, 1998.
- GREST, P.; ALBICKER, P.; HOELZLE, L. et al. Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Pathol.*, v. 126, p. 308-311, 2002.
- HALFEN, D.C.; VIDOR, T.; BRAGA, F.M. et al. Imunogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em vacinas inativadas de diferentes formulações. *Ciência Rural*, v. 30, n. 5, p. 851-856, 2000.
- HALFEN, D.C.; VIDOR, T. Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. MÉNDEZ, M.C.; et al. *Doenças de ruminantes e equinos*. São Paulo: Varela, 2001. v. 1, p. 98-108.
- HALL, W.T.K.; SIMMONS, G.C.; FRENCH, E.L. et al. The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust. Vet. J.*, v. 42, p. 229-237, 1966.
- HILL, B.D.; HILL, M.W.M.; CHUNG, Y.S. et al. Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. *Aust. Vet. J.*, v.61, p.242-243, 1984.
- HINZE, H.C.; WALKER, D.L. Response of cultured rabbit cells to infection with the Shope fibroma virus I. Proliferation and morphological alteration of the infected cells. *J. Bacteriol.*, v. 88, p. 1185-1194, 1964.
- HINZE, H.C. New member of the herpesvirus group isolated from wild cottontail rabbits. *Infect. Immun.*, v. 3, n. 2, p. 350-354, 1971.
- HORIUCHI, M.; YAMAZAKI, N.; FURUOKA, H. et al. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 57, p. 577-580, 1995.
- HÜBNER S.O.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L.G. et al. Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2005.
- HÜBNER S.O.; RIET-CORREA, F.; COSTA, P.B. et al. Relationship between polioencephalomalacia and encephalitis by bovine herpesvirus-5 in cattle. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1999, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte, 1999. p. 85.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm>. Acesso em: 05 Out. 2007.
- JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C.; MCGAVIN, M.D. A viral meningoencephalitis in calves. *Aust. Vet. J.*, v. 38, p. 207-215, 1962.
- JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C.; MCGAVIN, M.D. Studies on the transmissibility of a viral meningoencephalitis of calves. *Aust. Vet. J.*, v. 40, p. 189-194, 1964.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia veterinária*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 16, n. 1, p. 79-95, 2003.

JUBB, K.V.F.; HUXTABLE, C.R. The nervous system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic, 1993. v. 1, p. 267-439.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 171, p. 1055-1064, 1977.

KELLY, D.F. Experimental infection of rabbits with the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 58, p. 168-176, 1977.

KERR, M.G. *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KING, A.A.; TURNER, G.S. Rabies: a review. *J. Comp. Pathol.*, v. 108, p. 1-39, 1993.

KRAUS, A.L.; WEISBROTH, S.H.; FLATT, R.E. et al. Biology and diseases of rabbits. In: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEW, F.M. *Laboratory animal medicine*. Orlando: Academic, 1984. Cap. 8, p. 207-240.

KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W. Botulism. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). *Infectious diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford, 1994. p. 1355-137.

KUNRATH, C.F.; VOGEL, F.S.F.; OLDONI, I. et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 E BHV-5). *Ciência Rural*, v. 34, p. 1877-1883, 2004.

KUTISH, G.; ROCK, D. Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.*, v. 64, p. 5730-5737, 1990.

LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS R.A.A. et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural*, v. 33, n. 1, p.125-131, 2003.

LEMOS, R.A.A. *Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil*. 2005. 151f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L. Polioencefalomalácia. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. et al. *Doenças de ruminantes e equinos*. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. v. 2, p. 547-553.

- LIMA E.F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO R.S. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.
- LINDNER, A.; AMBROSIUS, H.; LIEBERMANN, H. Comparative studies on detection of BHV-5 antibodies in sheep with ELISA, serum neutralization, cell assay and immunofluorescence assay. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, v. 100, p. 440-442, 1993.
- LISBOA, J.A.; KUCHENBUCK, M.R.G.; DUTRA, I.S. et al. Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizootico dos bovinos no estado de São Paulo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 16, p. 67-74, 1996.
- LORENZIN, M.P.; CAMARGO, C.N.; SHIMOZONO, O.S. et al. Detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em amostras de cérebro bovino. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 71, p. 77, 2004.
- LUPTON, H.W.; BARNES, H.J.; REED, D.E. Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet.*, v. 70, p. 77-95, 1980.
- McKERCHER, D.G.; BIBRACK, B.; RICHARDS, W.P.C. Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the central nervous system of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 156, p. 1460-1467, 1970.
- MARÉ, C.J. Viral diseases. In: WEISBROTH, S.H.; FLATT, R.E.; KRAUS, A.L. *The biology of the laboratory rabbit*. New York: Academic, 1974. Cap. 10, p. 237-261.
- MAYER, S.V.; DE QUADROS V.L.; VOGEL, F.S.F. Dexamethasone-induced reactivation of bovine type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 39, p. 335-343, 2006.
- METZLER, A.E.; MATILE, H.; GASSMANN, U. et al. European isolates of bovine herpesvírus 1: comparison of restriction sites, polypeptides and reactive with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, v. 85, p. 57-69, 1985.
- METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.*, v. 87, p. 205-217, 1986.
- MEYER, G.; LEMAIRE, M.; LYAKU, J. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.*, v. 51, p. 27-40, 1996.
- MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.*, v. 146, p. 633-652, 2001.
- MIDDELKAMP, J.N.; FEED, C.A.; PATRIZI, G. Placental transfer of herpes simplex virus in pregnant rabbits. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, v. 125, p. 757-760, 1967.

- MORETTI, B.; ORFEI, Z.; MONDINO, G. et al. Infectious bovine rhinotracheitis clinical observations and isolation of virus. *Vet. Ital.*, v. 15, p. 676, 1964.
- MOTT, K.R.; OSORIO, N.; JIN, L.; et al. The bovine herpesvirus-1 LR ORF2 is critical for this gene's ability to restore the high wild-type reactivation phenotype to a herpes simplex virus-1 LAT null mutant. *J. Gen. Virol.*, v. 84, p. 2975-2985, 2003.
- NESBURN, A.B. Isolation and characterization of a herpes-like virus from New Zealand albino rabbit kidney cell cultures: a probable reisolation of virus III. *J. Virol.*, v. 3, n. 1, p. 59-69, 1969.
- OLIVEIRA, G.D.R. *Caracterização molecular de herpesvírus bovinos por análise da região codificadora da glicoproteína G*. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ONDERKA, D.K.; PAPP-VID, G.; PERRY, A.W. Fatal herpesvirus infection in commercial rabbits. *Can. Vet. J.*, v. 33, p. 539-543, 1992.
- PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann. Rech. Vet.*, v. 13, p. 221-235, 1982.
- PEDRAZA, F.J. e ALESSI, A.C. Encefalitis bovina por herpesvirus bovino tipo 5 (HVB-5). Una revisión. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, v. 17, n. 2, p. 148-155, 2004.
- PEIXOTO, Z.M.P.; CUNHA, E.M.S.; SACRAMENTO, D.R.V. et al. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.*, v. 31, n. 1, p. 72-75, 2000.
- PENNY, C.D.; HOWIE, F.; NETTLETON, P.F.; et al. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. *Vet. Rec.*, v. 151, p. 89-91, 2002.
- PÉREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R. et al. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.*, v. 39, p. 437-444, 2002.
- PÉREZ, S.E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J.H. et al. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. *Rev. Arg. Microbiol.*, v. 35, p. 69-73, 2003.
- POMERANZ, L.E.; REYNOLDS, A.E.; HENGARTNER, C.J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 69, n. 3, p. 462-500, 2005.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. et al. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 264p.
- QUINCOZES, C.G. *Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí*. 2005. 103f.

Dissertação (Mestrado em Virologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

REED, D.E.; BICKNELL, E.J.; BURY, R.J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 156, p. 753-755, 1973.

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L. et al. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino 1. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 9, p. 13-16, 1989.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1994 e comentários sobre algumas doenças. *Bolm Lab. Reg. Diagn.*, v. 15, p. 7-19, 1995.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERNANDES, C.G. Enfermidades do sistema nervoso dos ruminantes no Sul do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v. 28, p. 341-348, 1998.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. Vírus confundíveis com febre aftosa: Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, v. 26, p. 323-332, 1996.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D et al. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 26, n. 1, p. 44-46, 2006.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, S.N.; RECH, R.R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e

distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 26, n. 2, p. 123-132, 2006.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Semin. Virol.*, v. 4, p. 233-240, 1994.

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

ROEHE, P.M.; SILVA T.C.; NARDI, N.B.; et al. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 17, p. 41-44, 1997.

ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A. et al. Situação do BoHV-1 e BoHV-5 no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL – HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria, RS. *Anais...* Santa Maria: UFSM, 1998. p. 86-96.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C. et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.*, v. 146, p. 586-588, 2000.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B. The family

- herpesviridae: an update. *Arch. Virol.*, v. 123, p. 425-449, 1992.
- ROIZMAN, B.; PELLETT, P.E. The family herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed) *Fields virology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2381-2397.
- SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; ROEHE, P.M. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 18, p. 76-83, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 545p.
- SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 20, p. 113-118, 2000.
- SANTOS, L.B.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A. et al. Botulismo experimental em caprinos pela toxina tipo C1. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 13, p. 73-76, 1993.
- SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F.; FERREIRA, J.L.M. et al. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico em 1993. *Bolm. Lab. Reg. Diagn.*, v. 14, p. 23-26, 1994.
- SCHUDEL, A.A.; CARRILLO, B.I.; WYLER, R. et al. Infection of calves with antigenic variants of bovine herpesvírus 1 (BoHV-1) and neurological disease. *Zbl. Vet. med. B*, v. 33, p. 303-310, 1986.
- SEAL, B.S.; WHETSTONE, C.A. Immediate-early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvírus 1 and 5. *Vet. Microbiol.*, v. 38, p. 369-384, 1994.
- SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; LORETO, E.L.S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvírus type isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.*, v. 129, p. 191-199, 2007a.
- SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. et al. Identificação e diferenciação de Herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007b.
- SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO A.C. et al. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvírus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvírus type 5 challenge. *Vaccine*, v. 24, p. 3313-3320, 2006.
- SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. et al. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com herpesvírus bovino 5 (BHV-5). *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 18, p. 99-106, 1998.
- SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. et al. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvírus bovine type 5 (BHV-5). *Vet. Microbiol.*, v. 30, p. 22-31, 1999a.
- SILVA, A.M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L.F.; et al. Experimental infection of sheep with bovine herpesvírus type-5 (BHV-5):

- acute and latent infection. *Vet. Microbiol.*, v. 66, p. 89-99, 1999b.
- SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; et al., Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 22, p. 13-18, 2002.
- SPIEKER, J.O.; YUILL, T.M. Herpesvirus sylvilagus in cottontail rabbits: evidence of shedding but not transplacental transmission. *J. Wildl Dis.*, v. 13, p. 85-89, 1977a.
- SPIEKER, J.O.; YUILL, T.M. Herpesvirus sylvilagus in cottontail rabbits: attempted laboratory transmission by two insect species. *J. Wildl Dis.*, v. 13, p. 90-93, 1977b.
- SPIPKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; FRANCO, A.C. et al. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em coelhos. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 22, p. 58-63, 2002.
- SPIPKI, F.R.; FRANCO, A.C.; MARJORIE, B. et al. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 23, n. 1, p. 1-4, 2003.
- SPIPKI, F.R.; SILVA, A.D.; HÜBNER, S. et al. Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1026, p. 247-250, 2004.
- SPIPKI, F.R.; SILVA T.C.; ESTEVES, P.A. et al. Co-infections with bovine herpesvirus type 5 and bovine viral diarrhea virus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 5, p. 699-707, 2006.
- STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Iowa: Iowa State, 2002. 610p.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.*, v. 125, p. 584, 1989.
- TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S. et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. *Pesqui. Vet. Gaúcha*, v. 4, p. 61-65, 2001.
- VASCONCELOS, R.O.; VARASCHIN, N.S.; WOUTERS, F.; et al. Meningoencefalite bovina por herpesvírus. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1993, Santa Maria, RS. *Anais...* Santa Maria: 1993, p. 11.
- VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. et al. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciência Rural*, v. 32, n. 5, p. 881-883, 2002.
- VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.
- WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of inflammatory disease. In: FELDMAN, B.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. et al. *Schalm's*

veterinary hematology. 5. ed. Washington: Wiley, 2000. Cap. 35, p. 205-209.

WATT, J.A.; JONSTON, W.S.; BARLOW, R.M. Infectious bovine rhinotracheitis and encephalitis. *Vet. Rec.*, v. 108, p. 63, 1981.

WEIBLEN, R.; LOMBARRO, C.B.S.; CANABARRO, T.F. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.*, v. 124, p. 666-667, 1989.

WELLS, G.A.H.; SCOTT A.C.; JOHNSON, C.T. et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, v. 121, p. 419-420, 1987.

WEIBLEN, R; MORAES, M.P.; REBELATTO, M.C. Bovine herpesvirus isolates. *Braz. J. Microbiol.*, v. 27, n. 3, p. 87-90, 1996.

WEISSENBOCK, H.; HAINFELLNER, J.A.; BERGER, J. et al. Naturally occurring herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Pathol.*, v. 34, p. 44-47, 1997.

WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; ZEIDLER, M. et al. A new variant of Creutzfeldt-Jacob disease in the UK. *Lancet*, v. 347, p. 921-925, 1996.