

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

DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALITES HERPÉTICAS EM BOVINOS

ÉRICA AZEVEDO COSTA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária-UFMG
2007

Érica Azevedo Costa

DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALITES HERPÉTICAS EM BOVINOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Maurício Resende

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2007

*“Ó Senhor, Senhor nosso,
Quão magnífico em toda a terra é o teu nome!
Pois expuseste nos céus a tua majestade.
Quando contemplo os teus céus,
Obra dos teus dedos,
e a lua e as estrelas que estabeleceste,
Que é o homem, que dele te lembres
e o filho do homem, que o visites?
Fizeste-o, no entanto, por um pouco,
menor do que Deus
e de glória e de honra o coroaste.
Deste-lhe domínio sobre as obras da tua mão
e sob seus pés tudo lhe puseste:
Ovelhas e bois, todos,
e também os animais do campo;
as aves do céu, e os peixes do mar,
e tudo o que percorre as sendas dos mares.
Ó Senhor, Senhor nosso,
Quão magnífico em toda a terra é o teu nome!” Salmos 8*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, primeiramente, por TUDO. Muito Obrigada por todos os planos que o Senhor reservou para mim. Eis me aqui! Me capacite!

À minha mãe Maria Helena Azevedo Costa por toda a paciência, orações, apoio, consolo, por agüentar meus desesperos, inconstâncias, crises existenciais, choros e mais choros. Pelo amor e companheirismo.

Aos meus irmãos Marcelo e André pelo incentivo e apoio. Pela paciência neste período tão complicado.

À Denise pelas orações e amizade.

Aos meus amigos do IMA: Ronaldo, Marilda e Taismara. Ronaldo, este trabalho não sairia sem sua ajuda! Obrigada por me agüentar nos telefones e idas ao IMA! Taismara, nesta reta final, valeu por tudo! Muito obrigada pela paciência!

Ao prof. Mauricio Resende, pela orientação e confiança em mim depositada. Acho que te deixei, de lembrança, mais cabelos brancos!

À Tânia Mara por me agüentar no cultivo e por todas as ajudas! Ai de nós sem a Tânia!

À Marília pelo apoio e pelas “anotações no caderno”.

Aos meus amigos do LVC por terem me acolhido e suportado durante este período de maneira tão amorosa! Amo todos vocês!

Aos dinossauros do LVC: Saudações!

Aos meus co-orientadores: prof. Rômulo e profa. Zélia pelo voto de confiança. Profa. Zélia te agradeço pelas ajudas constantes.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de doenças infecciosas da prof. Zélia. Muito obrigada pelo carinho enorme!

Aos meus ICs Grabi Breder e Hábner Bastos. Vocês fazem parte deste trabalho! Muito Obrigada por tudo! Conquistamos juntos!

À todos os amigos e funcionários do ICB e da Escola de Veterinária, por sua compreensão, paciência e colaboração.

À tia Rose pela companhia, amizade e tudo o mais.

RESUMO

Um estudo das encefalites herpéticas em bovinos foi feito durante um período de novembro de 2004 a fevereiro de 2006, no estado de Minas Gerais. Foram analisadas 413 amostras de sistema nervoso central (SNC) de bovinos que morreram com sinais neurológicos, enviadas ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) para detecção do vírus da raiva, com resultado negativo. Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório de Saúde Animal (LSA) do IMA para detecção através de ensaios de PCR dos seguintes herpesvírus: herpesvírus bovino 1 (BHV-1), herpesvírus bovino 4 (BHV-4), herpesvírus bovino 5 (BHV-5), herpesvírus suíno 1 (SHV-1), herpesvírus ovino 2 (OHV-2) e herpesvírus alcelaphine 1 (AHV-1). Os dados referentes à origem, identificação do animal, rebanho, diagnósticos macro e microscópicos do SNC e sinais clínicos observados por veterinários autônomos ou do serviço oficial durante a coleta do material a campo, foram catalogados, revisados e posteriormente avaliados. Das 413 amostras de SNC, foi verificada uma alta ocorrência de BHV-5, com 188 (45,5%) amostras positivas, e somente uma amostra (0,2%) para o BHV-1. O SHV-1 foi detectado em 5 (1,2%) amostras, enquanto os OHV-2 e BHV-4 em 17 (4,1%) e 14 (3,4%) amostras, respectivamente. O AHV-1 não foi detectado em nenhuma amostra de SNC analisada. As lesões histopatológicas encontradas nos SNC, onde foram detectados os herpesvírus, foram classificadas como meningoencefalite não supurada. A evolução do quadro neurológico apresentada pelos bovinos infectados por algum dos tipos de herpesvírus pesquisados variou de 1 a 22 dias e a idade dos animais, entre 2 meses a 18 anos. As amostras de SNC dos bovinos pesquisados foram provenientes de 173 municípios, sendo que 106 (61,2%) apresentaram amostras positivas para algum dos herpesvírus. Todas as 10 regiões administrativas de Minas Gerais foram afetadas pelos herpesvírus, demonstrando assim, uma disseminação por todo o estado de Minas Gerais. Portanto, ficou evidenciada a necessidade de incluir a pesquisa dos herpesvírus, principalmente do BHV-5, no diagnóstico diferencial com outras doenças que acometem o SNC de bovinos, amostras estas que são geralmente submetidas apenas à pesquisa do vírus da raiva em Minas Gerais.

Palavras chave: Bovinos, encefalite, BHV-5, BHV-1, BHV-4, OHV-2, AHV-1, SHV-1, Minas Gerais.

ABSTRACT

A study about bovine herpetic encephalitis was performed in a period during November 2004 to February 2006 in the state of Minas Gerais, Brazil. Four hundred and thirteen (413) samples of the central nervous system (CNS) of bovines which died presenting neurological signs were analyzed and sent to the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) for rabies virus detection and tested negative. These samples were given by IMA's Animal Health Laboratory (*Laboratório de Saúde Animal – LSA*) for the detection, through PCR assays, of the following herpesviruses: bovine herpesvirus 1 (BHV-1), bovine herpesvirus 4 (BHV-4), bovine herpesvirus 5 (BHV-5), swine herpesvirus 1 (SHV-1), ovine herpesvirus 2 (OHV-2) and alcelaphine herpesvirus 1 (AHV-1). The data referring to the origin, the animal identification, herd, macroscopic and microscopic diagnosis of the CNS and clinical signs observed by independent veterinarians and official organs during the material collection in the field was filed, revised and subsequently evaluated. There was a high occurrence of BHV-5 in the 413 samples of CNS, with 188 (45.5%) positive samples, and only one (0.2%) sample positive for the BHV-1. The SHV-1 was detected in 5 (1.2%) samples whilst the OHV-2 and BHV-4 were detected in 17 (4.1%) and 14 (3.4%) samples respectively. The AHV-1 was not detected in any of the CNS samples analyzed. The histopathological lesions found in the CNS where the herpesviruses were detected were classified as non-suppurative meningoencephalitis. The course of the neurological disease presented by bovines infected with any kind of herpesvirus varied between 1 to 22 days and the age of the animals ranged between 2 months and 18 years old. The CNS samples derived from 173 municipalities and 106 (61.2%) presented positive samples for one of the herpesviruses. All ten (10) administrative regions of Minas Gerais were affected by the herpesviruses showing that the viruses are disseminated throughout the whole state of Minas Gerais. Therefore, it is obvious the necessity to include the herpesviruses tests, particularly the BHV-5, in the differential diagnostic, to rule out other diseases which affect the bovines CNS. In Minas Gerais, the collected samples are normally tested for the rabies virus only.

Key words: Bovines, encephalitis, BHV-5, BHV-1, BHV-4, OHV-2, SHV-1, Minas Gerais.

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios do sistema nervoso central (SNC) em bovinos abrangem um grupo vasto de agentes causadores como vírus, bactérias e também alterações degenerativas produzidas por intoxicações por plantas e micotoxinas. A importância dessas enfermidades cresceu desde o aparecimento, em 1985, da encefalopatia espongiforme bovina (BSE), cuja importância política, social e de saúde pública tornou-se mais evidente após o aparecimento de uma nova variante da doença em humanos, a Creutzfeldt-Jacob disease (CJD). Com isso, autoridades sanitárias internacionais começaram a exigir dos países exportadores de carne, como o Brasil, evidências de que seus rebanhos sejam livres de BSE. Todavia, mesmo na ausência de casos de BSE, os países devem estar capacitados a identificar outras doenças que afetam o SNC de bovinos.

De acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal- PPM 2003, que traça um perfil da produção brasileira de animais e de produtos de origem animal, o Brasil é possuidor do principal rebanho comercial bovino do mundo, atingindo, em 2003, um efetivo de 195,551 milhões de animais, o que representou um crescimento de 5,51% em relação ao ano anterior. Apesar dos estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso serem os principais produtores, concentrando, respectivamente, 12,78 % e 12,59% do rebanho brasileiro, Minas Gerais é o estado com maior produção de leite, mantendo 28,40% da produção do país.

O rebanho mineiro de bovinos, em 2002, foi estimado pelo IBGE em 20 milhões de cabeças. Anualmente, chegam ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), aproximadamente 700 amostras de sistema nervoso central de bovinos que apresentaram sinal clínico de encefalite, no estado de Minas Gerais. Cerca de 60% destas amostras são positivas para o vírus da raiva, sendo que o restante não possui um diagnóstico diferencial.

Além do vírus da raiva, alguns dos vírus que causam encefalite não supurada, geralmente fatal em bovinos são os herpesvírus: herpesvírus bovino 1 (BHV-1), herpesvírus bovino 5 (BHV-5), herpesvírus ovino 2 (OHV-2), um dos agentes

da febre catarral maligna e o herpesvírus suíno 1 (SHV-1), vírus da doença de Aujeszky ou Pseudorraiva.

Existe uma carência de dados sobre a distribuição da infecção encefálica por estes herpesvírus nos bovinos, em Minas Gerais. O presente trabalho propõe identificar através de ensaios de PCR específicos e exame histopatológico, os herpesvírus presentes no SNC dos bovinos que morreram com sinais nervosos enviados para o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), com resultado negativo para a raiva, durante o período de novembro de 2004 a fevereiro de 2006. Através de um formulário preenchido pelos veterinários e proprietários dos bovinos analisados, juntamente com informações adicionais pelo contato com os mesmos, foram feitas uma análise e correlação entre a distribuição por região, sexo, idade, raça e evolução clínica da doença neurológica de bovinos positivos e negativos para os herpesvírus. Acredita-se que esses conhecimentos poderiam fornecer subsídios para elaborar futuros programas de controle, avaliar possíveis falhas no uso e eficiência das vacinas, bem como o acompanhamento de reservatórios naturais.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1. Características dos Herpesvírus

A família *Herpesviridae* agrupa uma grande quantidade de espécies virais, que infectam a mais variada gama de hospedeiros, incluindo animais e plantas (Davison, 2002). É extremamente heterogênea, não diferenciável pela microscopia eletrônica, infectando vários tipos de tecidos, como nervoso, glandular, linfóides e órgãos parenquimatosos. A principal característica dessa família é a sua capacidade de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros e apresentar reativação periódica (Rock, 1994). A capacidade de estabelecer latência é uma das características responsável pela perpetuação e transmissão dos herpesvírus na natureza (Hossain et al., 1995).

Esta família foi dividida em três subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae* sendo que esta classificação se baseia nas propriedades biológicas destes vírus, como tipo de ciclo reprodutivo e tempo de

multiplicação em cultivo celular, além do tipo de célula onde é estabelecida a latência no hospedeiro (Roizman et al., 1992).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* são citolíticos, de replicação rápida e tem a capacidade para invadir, replicar e estabelecer latência em células do sistema nervoso do hospedeiro (Enquist et al., 1994; 1998). São integrantes desta família os herpesvírus bovino 1 (BHV-1), herpesvírus bovino 5 (BHV-5) e o herpesvírus suíno 1 (SHV-1), vírus da doença de Aujeszky (VDA). Os membros da subfamília *Betaherpesvirinae* são citomegálicos, de replicação lenta e tornam-se latentes nas glândulas secretórias e nos rins, como o citomegalovírus murino (MHV-5). Os membros da subfamília *Gamaherpesvirinae* possuem um tempo de replicação intermediária entre as duas outras subfamílias, sendo linfotrópicos e estabelecendo latência neste tecido (Roizman et al., 1992). Tem como representante o herpesvírus ovino 2 (OHV-2) causador da febre catarral maligna associada a ovinos (FCM-OA) e o herpesvírus bovino 4 (BHV-4) (Anderson et al., 2007).

Os herpesvírus são vírus grandes, de aproximadamente 120 a 300 nm, apresentando cerne formado por DNA linear de dupla fita, capsídeo icosadeltaédrico, envelope, no qual ficam projetadas as glicoproteínas virais e o tegumento, de natureza lipoprotéica, que separa o capsídeo do envelope (Wildy, 1986) (Fig. 1).

O genoma dos herpesvírus contém no mínimo 11 genes com potencial de codificar as glicoproteínas do envelope viral, que são extremamente importantes na relação vírus-hospedeiro e estão envolvidas no reconhecimento, adsorção, penetração dos vírus em células susceptíveis e na disseminação célula-célula.

Estas glicoproteínas (g) recebem o nome de letras do alfabeto, foram caracterizadas e designadas por homologia com as proteínas do herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1) sendo elas: gB (Whitbeck et al., 1988; Rós & Belak, 2002); gC (Fitzpatrick et al., 1988); gD (Tikoo et al., 1990); gE (Chowdhury et al., 2000); gG (Keil et al., 1996); gH (Meyer et al., 1999); gI (Delhon et al., 2003); gK (Khadr et al., 1996); gL (Khattar et al., 1996); gM (Wu et al., 1998).

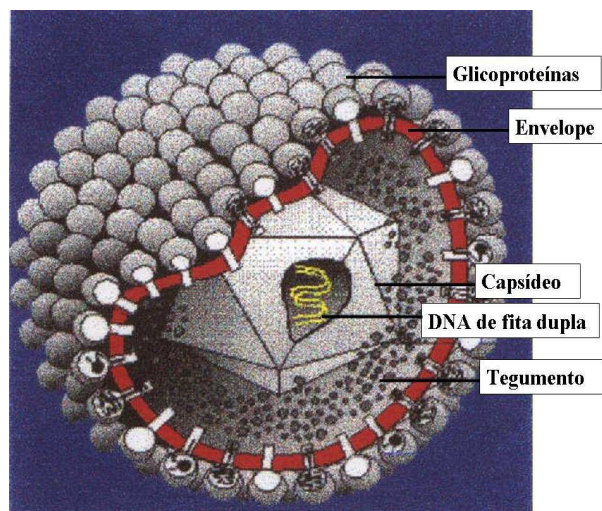


Figura 1. Representação dos elementos estruturais dos vírions dos herpesvírus. Todos os herpesvírus possuem 4 elementos estruturais: DNA de fita dupla, capsídeo, tegumento e envelope. Adaptado de Marko Reschke, 1997 - www.spectrosciences.com.

O DNA dos herpesvírus difere na composição de suas bases e no seu tamanho, que varia aproximadamente de 124 a 235 kb. O tamanho do genoma viral é característico para cada espécie viral e não é um reflexo do polimorfismo na composição de suas bases. A grande variação no conteúdo de G+C na composição de bases, de 32 a 75 % e a presença de seqüências repetidas internas e externas constituem características marcantes dos herpesvírus e classifica-os em seis grupos designados de A a F (Roizman et al., 1992).

Os herpesvírus são agentes etiológicos de várias doenças que causam significantes perdas econômicas em bovinos no Brasil e no mundo. Estão associados a doença respiratória, reprodutiva, cutânea, a queda na produção de leite e encefalite, sendo portanto, objetos de planos de controle e erradicação em todo mundo (Ackermann et al., 1990).

2.2. Herpesvírus encefálicos em Bovinos

As formas de meningoencefalites não supurativas causadas por vírus em bovinos, no Brasil, além da raiva, são as infecções herpéticas pelos herpesvírus bovino 5 (BHV-5), herpesvírus bovino 1 (BHV-1), herpesvírus suíno 1 (SHV-1) e herpesvírus ovino 2 (OHV-2) (Callan & Van

Metre, 2004; Costa & Resende, 2007). O herpesvírus bovino 4 (BHV-4), apesar de não ser considerado um vírus neurotrópico, tem sido isolado do SNC e líquido de bovinos que morreram com sinais neurológicos (Yamamoto et al., 2000; Fridgut & Stram, 2006).

O acompanhamento e a discriminação de enfermidades que afetam o sistema nervoso central com sinais clínicos semelhantes e, portanto, confundíveis com a raiva, são fundamentais para o conhecimento da ocorrência dessas doenças. Na maioria das vezes, as encefalites são diagnosticadas por uma avaliação clínica, mas a semelhança no sinal neurológico dificulta a interpretação clínica e frequentemente induz a diagnósticos equivocados. Um fator que contribui para o desconhecimento da ocorrência de encefalites herpéticas em bovinos é a dificuldade de realização de um diagnóstico diferencial entre as enfermidades que afetam o sistema nervoso central destes animais, além da falta de informação sobre essas doenças e a sua importância (Claus et al., 2002).

2.2.1. Herpesvírus Bovino 1 (BHV-1) e Herpesvírus Bovino 5 (BHV-5)

O BHV-1 e o BHV-5 são os principais herpesvírus bovinos identificados no Brasil (Teixeira et al., 1998), sendo descritos no Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al., 1996), Mato Grosso do Sul e São Paulo (Salvador et al., 1998), Paraná (Médici et al., 2000), Rio de Janeiro e Minas Gerais (Oliveira et al., 2003).

Os BHV-1 e BHV-5 estão classificados na subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Brown, 1989), são epitéliotrópicos e multiplicam-se inicialmente nas mucosas da região nasal, faringe e tonsilas. Após um primeiro ciclo de replicação viral na porta de entrada, inicia-se a fase aguda da infecção, que é caracterizada por sinais clínicos evidentes e excreção abundante de vírus infecciosos com ampla expansão da infecção para animais suscetíveis. A partir desse ponto, o vírus é transportado, via terminações nervosas dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo, até os gânglios sensoriais no SNC, onde pode permanecer em latência, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (Babiuk et al., 1996). Em bovinos, os locais de latência incluem o gânglio trigêmeo, córtex

telencefálico, mesencéfalo, ponte, cerebelo, medula e bulbo olfatório (Rissi et al., 2006).

Todos os herpesvírus são capazes de estabelecer infecção latente, a qual se caracteriza pela ausência de vírus infeccioso e de antígenos virais (Engels & Ackermann, 1996). Vários são os fatores associados com a reativação da latência, como o estresse, o transporte do animal, o tratamento com glicocorticóides e o parto. Novas partículas víricas são sintetizadas no sítio de latência e re-excretadas, podendo ocasionar a recorrência da doença (Babiuk et al., 1996).

O BHV-1 é o causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e tem sido alvo de estudos em várias partes do mundo, por causa do impacto extremamente negativo da infecção por esse vírus sobre a pecuária bovina (Costa et al., 2005). A infecção pelo BHV-1 caracteriza-se pelas diversas formas clínicas que apresenta, incluindo doença respiratória, vulvovaginite, balanopostite, diminuição nos índices de fecundação, queda brusca na produção de leite e encefalite. O BHV-1 foi classificado em três subtipos: subtipo 1 (BHV-1.1), relacionado a infecções no trato respiratório, subtipo 1.2a (BHV-1.2a) e subtipo 1.2b (BHV-1.2b), relacionados a infecções no trato reprodutivo (Roizman et al., 1992).

O BHV-5, inicialmente classificado como BHV-1.3, está relacionado com infecções neurológicas. Nos dias de hoje o BHV-5 é reconhecido como causador de epidemias de encefalite em bovinos (Abdelmagid et al., 1995). A enfermidade neurológica é caracterizada por uma meningoencefalite, de curso geralmente fatal, afetando principalmente animais jovens submetidos a situações de estresse (Lovato, 1998; Roehe et al., 1998), embora possa também afetar animais adultos (Rissi et al., 2007).

Os sinais clínicos mais frequentes da forma nervosa por BHV-5 são caracterizados por anorexia, corrimento nasal e ocular e sinais nervosos como incoordenação, depressão profunda, nistagmo, opstótono, tremores musculares, andar em círculos, andar cambaleante, convulsões e quedas. A depressão profunda pode ser um sinal clínico evidente nos primeiros 2 a 3 dias da doença (Claus et al., 2002). A evolução do quadro clínico nos bovinos afetados pela meningoencefalite por BHV-5

varia de 1 a 15 dias, usualmente ocorrendo morte dos animais e se inicia após um período de incubação de 7 a 10 dias (Rissi et al., 2006).

Em bovinos maiores de 6 meses, observam-se lesões somente no SNC. Macroscopicamente, o córtex cerebral pode apresentar áreas de coloração amarela ou acinzentada. Ocasionalmente, essas áreas apresentam-se deprimidas, podendo observar-se, também, cavitação da substância cinzenta. As lesões não são simétricas, têm ampla variação entre os bovinos e são claramente mais intensas nas porções rostrais do encéfalo (Rissi et al., 2006).

As lesões histológicas da forma nervosa caracterizam-se por meningoencefalite não supurativa necrosante, que varia quanto à localização e intensidade em cada caso e em seções do encéfalo de um mesmo caso (Rissi et al., 2007). A intensidade das lesões é mais acentuada, em ordem crescente, na região cortical dos lobos frontais do telencéfalo, cápsula interna e núcleos da base, tálamo, córtex parietal, mesencéfalo, ponte, córtex occipital, bulbo, cerebelo e hipocampo. Os achados são infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário ou misto nos espaços de Virchow-Robin ou ao redor de vasos meníngeos e necrose neuronal caracterizada por encolhimento e eosinofilia do citoplasma e núcleo picnótico. Inclusões intranucleares eosinofílicas em astrócitos e neurônios podem ser encontrados, sendo mais freqüentes em áreas de inflamação e malácia (Claus et al., 2002; Elias et al., 2004).

Em bezerros de até 3 meses de idade, acometidos pela forma sistêmica, além das lesões do SNC, observam-se ulcerações no sistema digestivo, principalmente abomaso e rúmen, e ainda, hepatomegalia, pericardite e pneumonia. O infiltrado de células mononucleares é marcante nas áreas afetadas, em todas as formas da doença (Alice, 1978).

Apesar das infecções neurológicas em bovinos estarem relacionadas com o BHV-5, há ocorrência de casos de encefalite, em bovino adulto, cujo agente etiológico é o BHV-1 (Roels et al., 2000). Mesmo que os achados clínicos e patológicos das encefalites induzidas pelo BHV-1 sejam parecidos com os associados ao BHV-5, ainda permanecem desconhecidos os mecanismos que levam a essa tendência

aparentemente esporádica do BHV-1 de induzir encefalites. (Roels et al., 2000).

Entretanto, há casos de bovinos que desenvolveram sinais de comprometimento neurológico provocados pelo BHV-1 a campo, cujos achados histopatológicos não revelaram lesões indicativas de encefalite (Roels et al., 2000). Nesses casos, são observadas uma vasculite e trombose no pulmão e cérebro, sendo que o último apresenta focos de necrose neuronal, sem lesões neuronais que pudessem ser atribuídas a um efeito citopático diretamente causado pelo vírus. Isso sugere que, em casos de ausência de encefalite, os sinais neurológicos provocados pelo BHV-1 estejam associados somente a danos no fluxo sanguíneo encefálico (Spilki et al., 2002).

A infecção pelos BHV-1 e BHV-5 só pode ser confirmada pelo diagnóstico laboratorial, visto que não existem sinais clínicos característicos da doença (Kramps et al., 1996; Rissi et al., 2007). Deste modo, é importante a coleta e conservação do material a ser enviado para o laboratório, principalmente o SNC. O melhor método de diagnóstico é o isolamento do vírus em cultivo de células de origem bovina, sobre as quais o vírus causa um efeito citopático característico após alguns dias de cultivo. O vírus isolado deve ser identificado pela técnica de imunofluorescência ou neutralização viral. Atualmente, outros métodos de detecção viral, rápidos e específicos, como a técnica de imunoperoxidase e a PCR começaram a fazer parte da rotina dos laboratórios de diagnóstico (Cândido et al., 2000). O diagnóstico histopatológico, principalmente nos abortos e na forma nervosa, é importante para a constatação das lesões características e a observação de corpúsculos de inclusão (Rissi et al., 2006). No material para histopatologia, o vírus pode ser identificado por imunohistoquímica. Quando suspeita-se de meningoencefalite, deve ser enviado o encéfalo, metade em formalina tamponada (10-25%) e metade resfriado (Claus et al., 2002).

A diferenciação sorológica entre o BHV-1 e o BHV-5 é de difícil realização devido à ocorrência de extensas reações cruzadas que não permitem o estabelecimento da proporção de animais supostamente infectados com o BHV-1, que na verdade foram infectados com o BHV-5.

Desta forma, é desconhecida a prevalência do BHV-5 no mundo (Claus et al., 2002). Levantamentos sorológicos indicam que o BHV-1 está disseminado nos rebanhos de todo o Brasil, embora grande parte dos bovinos soropositivos para o BHV-1 possam estar infectados pelo BHV-5 (Salvador et al., 1998).

2.2.2. Febre Catarral Maligna Associada a Ovinos (FCM-AO)

A febre catarral maligna (FCM) é uma doença linfoproliferativa geralmente fatal, que ocorre de forma esporádica ou endêmica em bovinos e outros ruminantes domésticos ou silvestres como búfalos, bisões e cervos e ocasionalmente em suínos (Smith, 2002). Estes animais são considerados animais clinicamente susceptíveis a FCM (Garmatz et al., 2004).

Os “vírus do grupo da FCM” pertencem ao gênero *Rhadinovirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae* e são definidos pela presença do epitopo antigênico 15-A e pelo alto grau de similaridade em regiões conservadas do gene da DNA polimerase. A forma africana é induzida por 7 tipos de gammaherpesvírus diferentes (Li et al., 2003). A forma africana clássica ou FCM associada a gnus (FCM-AG) foi a primeira forma africana notificada, é transmitida por gnus (*Connochaetes taurinus* e *C. gnu*, subfamília *Alcelaphine*) e está relacionada ao alcelaphine herpesvírus 1 (AHV-1). Nenhum caso da forma africana da FCM foi relatado no Brasil. A forma denominada FCM associada a ovinos (FCM-AO) é causada pelo herpesvírus ovino-2 (OHV-2) e transmitida por ovinos e provavelmente caprinos (OIE, 2000; Brenner et al., 2002), considerados hospedeiros reservatórios do OHV-2.

No Brasil, a FCM-AO foi descrita pela primeira vez na Paraíba em 1924 e depois diagnosticada em outros estados do Nordeste, como Rio Grande do Norte, Bahia, Sergipe, Piauí e Pernambuco (Macêdo et al., 2007). Posteriormente, outras regiões do país foram afetadas como o Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Rio Grande do Sul (Sampaio et al., 1972; Marques et al., 1986; Garmatz et al., 2004; Rech et al., 2005). O herpesvírus caprino 2 (CHV-2), transmitido por caprinos (Li et al., 2005) nunca foi relatado no Brasil.

A infecção pelo OHV-2, como em todos os gammaherpesvírus, difere entre os hospedeiros reservatórios e os animais clinicamente susceptíveis. Os hospedeiros reservatórios geralmente são infectados subclínicamente com o OHV-2 e portanto, não desenvolvem a doença tornando-se a principal fonte de disseminação e transmissão do vírus para os animais clinicamente susceptíveis (Baxter et al., 1993). Por outro lado, os animais clinicamente susceptíveis são infectados de forma hiperaguda, aguda ou crônica, desenvolvendo a doença FCM (Ackermann, 2006).

A FCM pode se apresentar clinicamente nas formas digestiva, “cabeça-e-olho”, nervosa ou dérmica com evolução hiperaguda, aguda ou crônica (Smith, 2002). A taxa de morbidade da FCM em bovinos é baixa, de 2 a 20% e a taxa de mortalidade é muito alta, de 83 a 100% (Rech et al., 2005). O período de incubação da FCM é de 3 a 10 semanas, mas pode se estender por mais de 10 meses. O número de bovinos doentes em um mesmo período e propriedade é usualmente baixo (O’Toole et al., 1997).

Na forma “cabeça-e-olho”, os sinais clínicos iniciam-se por febre, corrimento nasal e ocular seroso e edema da pálpebra e conjuntiva. O corrimento nasal evolui rapidamente para corrimento muco-purulento espesso e ocorre opacidade da córnea. Sialorréia, necrose das papilas bucais, lesões erosivo-ulcerativas na cavidades oral, linfadenopatia, conjuntivite, diarreia e distúrbios nervosos são observados (Macêdo et al., 2007). Na forma nervosa, os sinais neurológicos freqüentemente relatados incluem apatia, incoordenação, hipermetria, tremores musculares, agressividade, cegueira, quedas, opstótono, movimentos de pedalagem e convulsões. (Rech et al., 2005).

Os achados de necrópsia incluem lesões erosivo-ulcerativas nas superfícies mucosas dos tratos alimentar, respiratório, urinário e genital e lesões oculares (Rech et al., 2005). As principais alterações histológicas, em geral, consistem de três categorias de lesões: vasculites, necrose dos epitélios de revestimento e acúmulo de células inflamatórias mononucleares (linfoblastos, linfócitos, plasmócitos e histiócitos), em vários tecidos, principalmente no SNC, rins e parede vascular (Sanches et al., 2000; Anderson et al., 2007).

A patogenia da FCM não está completamente esclarecida. A vasculite característica tem sido interpretada como uma evidência de que as lesões resultem de um distúrbio imunológico induzido pelo vírus e não da ação citolítica direta do vírus. Uma vez que os gamaherpesvírus favorecem a latência, ao contrário dos alphaherpesvírus, fazendo-a nos linfócitos T e órgãos linfóides, enquanto somente um subsítio de células suportam a replicação lítica. Com isso, sugere-se que os eventos principais na patogenia da FCM sejam a perda da atividade dos linfócitos supressores, facilitando a proliferação linfóide observada na doença e a atividade descontrolada de células Natural Killer (NT), responsável pela destruição tecidual (Garmatz et al., 2004; Ackermann, 2006). Entretanto, estudos *in vitro* demonstraram que um misto de células infectadas latentemente e produtivamente são observadas em algumas culturas de células T de bovinos, indicando que o ciclo lítico em células T de animais clinicamente susceptíveis seja um evento freqüente. Foi demonstrado que sítios de replicação do OHV-2 ocorrem em diversos órgãos dos animais clinicamente susceptíveis como traquéia, pulmões, linfonodos mesentéricos, baço e intestino. Isso sugere que, talvez, em animais clinicamente susceptíveis, a replicação ocorra nos leucócitos que infiltram nos tecidos e não nas células parênquimais (Cunha et al., 2007).

O diagnóstico de FCM é baseado, principalmente, nos sinais clínicos, achados de necrópsia e confirmado pela histopatologia. A técnica de PCR para detecção da presença do DNA viral no SNC de bovinos e a transmissão experimental da doença em coelhos também podem ser empregadas. O isolamento do OHV-2 não foi ainda relatado (Rech et al., 2005).

O diagnóstico diferencial de FCM em bovinos inclui outras doenças à vírus, como febre aftosa (FA), estomatite vesicular (EV), diarreia bovina viral-doença das mucosas (BVD-MD), língua azul (LA), peste bovina (PB) e intoxicação por arsênio (Smith, 2002), pelo cogumelo *Ramaria flavo brunnescens* (Santos et al., 1975) ou por *Amaranthus spp* (Torres et al., 1997).

Presume-se que a transmissão da FCM-OA para bovinos ocorra pelo contato com ovinos, principalmente em época de parição. De acordo

com Garmatz et al. (2004), alguns bovinos afetados durante a ocorrência de FCM no Rio Grande do Sul, não tiveram contato com ovinos. Como é geralmente aceito que os ovinos sejam portadores do vírus da FCM e que o transmitam para bovinos, a observação desse dado epidemiológico é importante (O'Toole et al., 1997). No entanto, há casos da infecção transplacentária de FCM em bovinos (Plowright, 1990) e bisões (Schultheiss et al., 1998), fazendo com que a manutenção do vírus em animais que nasçam infectados seja outra possibilidade. Casos de bovinos infectados cronicamente com o OHV-2 e de animais recuperados da doença clínica e que poderiam se tornar portadores, bem como animais silvestres como veados (O'Toole et al., 1997; Driemeier et al., 2002; Schultheiss et al., 1998).

2.2.3. Herpesvírus Suíno 1 (SHV-1) ou Vírus da Doença de Aujeszky (VDA)

O Herpesvírus suíno-1 (SHV-1) também conhecido como vírus da doença de Aujeszky (VDA) ou Pseudorraiva é altamente contagioso. A doença de Aujeszky (DA) tem distribuição mundial, sendo que no Brasil tornou-se relevante nos últimos anos, com o registro de vários surtos nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, que são exportadores de material genético (Souza et al., 2002).

Apesar de pertencer à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Murphy et al., 1999), nos quais cada integrante fica restrito a poucas ou mesmo a uma única espécie hospedeira, o SHV-1 constitui uma notável exceção devido ao seu amplo círculo de hospedeiros que inclui muitos mamíferos, como os bovinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos e eqüinos. Estes animais são considerados hospedeiros terminais, morrendo antes mesmo da soroconversão. Por fugirem a esta regra, os suínos constituem o reservatório natural do vírus, que pode permanecer em estado de latência ou ser eliminado sem que o animal apresente sinais clínicos (Gustafson, 1986).

O VDA compartilha características comuns a outros membros da família *Herpesviridae*, como estabelecer infecção latente ou invadir o SNC após a infecção primária, através da migração do vírus para os gânglios nervosos, via terminações nervosas periféricas. Em suínos, os locais de

latência incluem o gânglio trigêmio, bulbo olfatório e córtex telencefálico (Yoon et al., 2006). O estabelecimento de latência torna o animal uma fonte de disseminação viral durante toda a vida. O vírus pode reativar da latência e ser excretado quando o animal sofre algum estresse (Silva et al., 2005).

As populações selvagens de suiformes digástricos constituem um importante reservatório natural do VDA (Schmitt et al., 1991) transmitindo-o facilmente aos suínos domésticos e aos cães, que podem ser infectados em ataques. A presença endêmica do vírus nessas populações selvagens pode representar um impedimento à erradicação do VDA entre os suínos domésticos (Van-Der-Leek et al., 1993).

Bovinos são mais resistentes ao contágio que os suínos, sendo infectados através da inalação de aerossóis, mordidas e lambidas de suínos que excretam o vírus e alimentação à base de carcaça de suínos (Beran, 1993).

Nos bovinos, a infecção pelo SHV-1 é invariavelmente fatal, podendo ocorrer mortes súbitas, sem nenhum sinal da infecção (Flatschart & Resende, 2001). Pode aparecer intenso prurido local, com violentas lambidas, mordidas e esfregadas do animal, mas não é freqüente. O prurido pode se localizar em diversas partes do corpo, mas principalmente na cabeça, flancos ou patas, que são os locais mais facilmente atingidos pelo vírus. Durante essa fase, há intensa excitação, convulsões e segue-se um estágio de paralisia, com salivação, dificuldade respiratória, ataxia. O aumento da temperatura corporal (40-41°C) e a paralisia final são seguidos pela morte do animal, após 6 a 48 horas (Murphy, et al., 1999).

Nos animais afetados, a similaridade de alguns dos aspectos clínicos provocou, inicialmente, certa confusão sobre a relação da raiva com essa doença, que ainda é conhecida nos EUA como pseudoraiva. A VDA foi diferenciada da raiva por vários critérios como sua facilidade de transmissão por inoculação subcutânea, período de incubação, sinais clínicos e evolução clínica em coelhos e camundongos (Flatschart & Resende, 2001).

O diagnóstico de campo, em bovinos, pode se basear no histórico e nos sinais clínicos, como a

presença de suínos na região e/ou propriedade e animais apresentando a peste de coçar ou paralisia dos membros posteriores, que são evidências epidemiológicas da ocorrência da doença de Aujeszky. A observação de relatos de mortalidade repentina de cães e gatos é importante. Porém, um diagnóstico definitivo somente pode ser obtido através de exames laboratoriais (Sandrin, 2000).

Os órgãos de escolha para a realização do diagnóstico virológico são o cérebro e cerebelo. O VDA pode ser diagnosticado laboratorialmente através da inoculação de uma suspensão de 10% de cérebro de bovino ou suíno mortos com suspeita da infecção em coelhos e camundongos, que são altamente sensíveis à infecção pelo VDA. Em 12-72 horas, aparecerão os sinais de prurido no ponto de inoculação, com morte entre 24-36 horas. O isolamento viral em cultivos celulares de rim de suínos "SK6" e posterior confirmação da identidade viral por imunoperoxidase ou PCR tem sido feitos (Cândido et al., 1999). O envio de fragmentos de medula e/ou cérebro de animais mortos com suspeita da infecção (medula ou cérebro) em líquido conservados de Vallée ou glicerina a 50% e a sua rapidez são muito importantes para o sucesso do isolamento viral, por ser o VDA pouco resistente as condições ambientais (Herrmann et al., 1984).

O diagnóstico sorológico, como a soroneutralização (SN) e o kit ELISA diferencial para gE, tem sido amplamente utilizado em programas de erradicação por todo o mundo, inclusive no Brasil (Groff et al., 2005). Isso ocorre por que os suínos adultos aparentemente saudáveis, portadores em potencial, possuem níveis elevados de anticorpos (Sandrin, 2000). Em bovinos, considerados hospedeiros terminais, o diagnóstico sorológico não é utilizado, pois morrem antes mesmo da soroconversão (Flatschart Resende, 2001).

O VDA é um dos mais significativos patógenos virais na produção de carne suína tendo importância no ponto de vista econômico quando suas conseqüências naturais ou os custos decorrentes de uma erradicação necessária levam a um balanço econômico desfavorável à produção. Na suinocultura dos países da Comunidade Européia, a doença de Aujeszky é, no momento, a infecção mais importante,

havendo grandes esforços para erradicá-la (Silva et al., 2005). No Brasil, o controle da doença em granja de suínos é realizado através de inquéritos sorológicos (Carvalho et al., 1994) e eliminação de animais soropositivos, sendo a vacinação autorizada em certas circunstâncias (Morés & Zanella, 2003).

2.2.4. Herpesvírus Bovino 4 (BHV-4)

De todos os herpesvírus de bovinos, o BHV-4 é o mais intrigante por ser isolado de bovinos aparentemente saudáveis bem como de uma ampla variedade de condições clínicas como abortos, lesões de pele, metrite, mastite, mamilite ulcerativa, tumores de bexiga e rúmen, casos de febre catarral maligna e infecções ocular, respiratória, genital, entérica e neurológica (Asano et al., 2003; Dewals et al., 2006).

Devido à estreita extensão de hospedeiros, ao ciclo reprodutivo lento com baixo título viral e efeito citopático lento, propriedades comuns aos citomegalovírus (CMV), o BHV-4 foi primeiramente agrupado na subfamília Betaherpesvírus. Entretanto, por ser isolado em cultivo celular de várias espécies e tecidos como células renais de cabras, ovelhas, cães, coelhos, galinhas e cultura de células bovinas como rins, testículos e fossas nasais; além de sua predileção por órgãos linfóides e baseado na sua estrutura genômica, o BHV-4 foi incluído no grupo dos herpesvírus linfotrópicos da família dos gammaherpesvírus, subfamília *Rhadinovírus* (Goyal & Naeem, 1992).

A análise por restrição enzimática (RE) do DNA viral é uma excelente ferramenta para detectar subgrupos dos herpesvírus e para reconhecer variantes entre diferentes amostras. Vários estudos relataram que os perfis de restrição do DNA dos BHV-4 diferem completamente dos outros herpesvírus (Goyal & Naeem, 1992). O BHV-4 foi dividido em 2 grupos por análise de restrição enzimática utilizando as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*. Um dos grupos é o Movar33/63-like (Movar-like) e o outro é o DN599-like. A maioria das amostras de BHV-4 pertencentes ao grupo Movar33/63-like foi isolada na Europa, enquanto os isolados

pertencentes ao grupo DN599-like, na América do Norte (Monge et al., 2006).

Parece que a infecção pelo BHV-4 tem aumentado e que uma forte associação existe entre altos títulos de anticorpos para o BHV-4 e infecções do trato reprodutivo em bovinos (Goyal & Naeem, 1992). Embora uma possível função em infecções do trato respiratório e genital seja relatada e por ser isolado em condições clínicas diversas, inoculações experimentais da maioria dos BHV-4 em bovinos e em animais de laboratório não reproduzem a doença clínica. Nenhum sinal clínico nem histológico de doença tem sido observado após uma reativação viral através de tratamento com dexametasona em bovinos com infecção persistente em células mononucleares. Isso sugere que a reativação do BHV-4 pode estar relacionada a fatores ou condições adicionais para tornar-se patogênico (Goyal & Naeem, 1992). Portanto, a patogenia desse vírus, ainda não foi definida (Izumi et al., 2006).

É possível que o vírus entre no organismo do hospedeiro pela via oronasal, multiplicando-se nas células mononucleares e disseminando por todo o corpo através dessas células, podendo ser isolado de vários tecidos (Goyal & Naeem, 1992). O vírus pode se multiplicar, também, na conjuntiva, mucosa do trato respiratório superior e mucosa genital, resultando em excreções ocular, nasal e vaginal ou metrite em vacas pós-parturientes (Goyal & Naeem, 1992).

O BHV-4 já foi isolado de linfonodos, baço, tonsilas, rins, leucócitos do sangue periférico, macrófagos, células endoteliais, leite e tecidos nervosos, como medula espinhal, gânglio trigêmio e cérebro (Bona et al., 2005; Donofrio et al., 2005). Isso indica que este vírus tem predileção por diferentes órgãos do corpo sendo capaz de estabelecer uma infecção persistente (Yamamoto et al., 2000). A associação do BHV-4 com órgãos linfóides e uma prolongada viremia associada com células mononucleares, com permanente transporte através das vias linfática e hematogênica por longos períodos de tempo, podem explicar a razão pela qual o BHV-4 é detectado em diversos tecidos e síndromes clínicas (Goyal & Naeem, 1992).

Órgãos linfóides e células mononucleares do sangue possivelmente podem ser sítios de latência do BHV-4 em bovinos (Yamamoto et al., 2000). Alguns estudos sugerem que macrófagos do baço podem ser sítios de latência, mas também de replicação do BHV-4 (Goyal & Naeem, 1992). Embora o BHV-4 não seja considerado um vírus neurotrópico, foi detectado no SNC em casos de infecção persistente (Izumi et al., 2006). Além disso, foi detectado também no SNC e no líquido de animais que apresentaram sinais neurológicos como ataxia, com lesões histopatológicas típicas de encefalite (Yamamoto et al., 2000; Fridgut & Stram, 2006). Contudo, não está muito clara a interação direta entre o BHV-4 e neurônios. Entretanto, sugere-se que o sistema nervoso seja incluído como um sítio de latência, embora sua função em infecções agudas e latentes seja questionável (Izumi et al., 2006).

Os gammaherpesvírus, assim como o BHV-4, podem ser agentes causadores de lesões vasculares em mamíferos. Estudos *in vitro* mostraram que as células endoteliais de bovinos são susceptíveis a infecção pelo BHV-4. Em transmissão experimental com coelhos, nas infecções agudas, nenhuma lesão histológica foi encontrada, mas sinais de replicação viral foram detectados por PCR, isolamento viral e imunofluorescência. As lesões foram encontradas somente em infecções crônicas pelo BHV-4, caracterizadas por uma vasculite local aguda ou crônica, sinais de endocardite crônica com acúmulo de células mononucleares (histiócitos e linfócitos) e trombo (Egyed & Baska, 2003).

A prevalência de infecções pelo BHV-4 varia em diferentes países. O uso dos testes de imunofluorescência indireta (IFAT) e soroneutralização viral (NV) simplificaram os estudos sobre a prevalência de infecções pelo BHV-4 em bovinos de diversos países (Goyal & Naeem, 1992). Nos EUA, desde 1971, casos de BHV-4 têm sido relatados, sendo que a soroprevalência do BHV-4 é de 70 a 86% em bovinos com problemas reprodutivos e/ou respiratórios. Na Suécia, 4,2% dos bovinos foram soropositivos. Na Alemanha, 18,4% foram soropositivos para o BHV-4, mas em alguns centros de inseminação artificial até 70% dos touros foram soropositivos. Na Bélgica, 38% dos

bezerros analisados foram soropositivos. A presença do vírus ou anticorpo na população bovina do Kênia, Tanzânia, África, Espanha, Japão e Israel tem sido relatada e está associada com algum sinal clínico como metrite pós-partos, encefalite, conjuntivite e doenças do trato respiratório (Goyal & Naeem, 1992; Fridgut & Stram, 2006; Izumi et al., 2006; Monge et al., 2006). No Brasil, estudos de pesquisa de antígenos do BHV-4 estão sendo feitos no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e nos Recursos Humanos do Agronegócio (ReHAgro) que tem divulgado informações em cadernos técnicos, a respeito do BHV-4 como um dos possíveis vírus que podem influenciar na mastite bovina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de SNC de bovinos usadas no presente estudo

Durante o período de novembro de 2004 a fevereiro de 2006, 413 amostras de SNC (cérebro e cerebelo) de bovinos, refrigeradas, foram cedidas pelo Laboratório de Saúde Animal (LSA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) ao Laboratório de Virologia Comparada (LVC-ICB/UFMG) para detecção através de ensaios de PCR dos herpesvírus: BHV-1, BHV-4 e BHV-5, SHV-1, OHV-2, AHV-1 e CHV-2. As amostras eram sabidamente negativas para raiva (previamente submetidas no LSA às técnicas de imunofluorescência indireta e inoculação em camundongos). Os dados referentes à origem, identificação do animal, rebanho, e sinais clínicos obtidos por veterinários autônomos ou do serviço oficial durante a coleta do material a campo, foram catalogados e posteriormente avaliados pelo LVC-ICB/UFMG (Anexo 1). Informações adicionais dos animais analisados foram obtidas diretamente com os veterinários responsáveis e com os proprietários.

Como o vírus da doença de Aujeszky pode ser diferenciado do vírus da raiva e de outros herpesvírus encefálicos que acometem bovinos através da inoculação em camundongos, que são altamente sensíveis à infecção pelo SHV-1 (Flatschart & Resende, 2001), a amostragem para o SHV-1 foi feita de maneira diferenciada. Somente foram pesquisadas para o VDA, amostras de SNC de bovinos onde ocorreu morte

precoce (12-24 horas) dos camundongos após inoculação intracerebral.

3.2. Exame Histopatológico

As amostras de SNC, que apresentavam fragmentos conservados em formol a 10%, foram submetidas à avaliação histopatológica no LSA / IMA, cujo laboratório de Patologia é credenciado e auditado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para atender às exigências do Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias (EET's). Posteriormente, os resultados foram cedidos ao LVC-ICB/UFMG para análise.

3.3. Processamento das Amostras Clínicas

3.3.1. Extração do DNA total dos fragmentos de SNC

As amostras de fragmentos de SNC foram suspensas em solução salina 20% (p/v), trituradas e clarificadas a 2.000 x g, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi usado para precipitação viral com polietilenoglicol (PEG), de acordo com o protocolo descrito por Rosenthal et al. (1993) com algumas modificações. Uma solução de 2,2% (p/v) de NaCl foi adicionada ao sobrenadante e homogeneizada sob a agitação a 4 °C. Após a dissolução completa foi adicionado 6% de PEG 8.000 (p/v) e novamente homogeneizado sob agitação a 4 °C por um período mínimo de 4 horas.

O complexo vírus-PEG foi sedimentado por centrifugação a 2.000 x g durante 2 horas a 4 °C e dissolvido em 1:50 a 1:100 do volume original em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1% para a extração do DNA total através da técnica da sílica descrita por Boom et al. (1990) com algumas modificações. De acordo com o volume final, foram adicionados 3 volumes de NaI 6M, aquecendo o tubo a 55 °C por 15 minutos. Após esse procedimento, uma quantidade de sílica necessária para ligar-se a todo o DNA presente foi acrescentada à solução (Para cada 1 µg de DNA foram necessários 5µl de sílica) e homogeneizada no vórtex por alguns segundos. Esta solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente em um agitador do tipo “end-over-end”. Para sedimentar a matrix, a solução foi centrifugada por 30

segundos a 5.600 x g, descartando o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Após tal procedimento, o sedimento foi ressuscitado gentilmente com NaI 6M em uma quantidade equivalente a 25 vezes o volume da sílica, vortexando rapidamente. Após centrifugação por 30 segundos a 5.600 x g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado 2 vezes com tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,5 mM de EDTA; Etanol 60%). Na última centrifugação, todo o tampão de lavagem foi descartado e centrifugado novamente para retirar possíveis restos de tampão de lavagem. Foi adicionado, ao sedimento, acetona P.A. no mesmo volume da solução de lavagem, homogeneizando no vortex rapidamente. A solução foi centrifugada a 5.600 x g por 30 segundos e incubada a 50 °C por 10 minutos com a tampa aberta. O sobrenadante foi descartado e o sedimento eluído em 50 µL de água ultrapura estéril e incubado a 50 °C por 5 minutos. Para compactar o sedimento, a solução foi centrifugada rapidamente a 5.600 x g e o sobrenadante contendo o DNA, transferido para um tubo de 200 µL.

As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro Gene Quant RNA/DNA Calculator (Pharmacia). Foi considerado que 1 OD_{260 nm} equivale a 50 µg/mL de DNA. Após a análise dos resultados obtidos, as amostras que apresentaram concentração muito baixa ou razão entre a DO_{260 nm}/DO_{280 nm} menor que 1,7 foram submetidas à nova extração para garantir a pureza e viabilidade do DNA extraído (Sambrook et al., 1989). Em cada reação de PCR foram utilizados 200 nm de DNA.

3.3.2. Condições da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para detectar a presença dos herpesvírus estudados, o DNA total extraído das amostras do SNC de bovinos foi empregado como molde em ensaios de PCR utilizando diferentes oligonucleotídeos iniciadores (OI) que amplificam diferentes regiões do genoma dos vírus mencionados anteriormente. Foram utilizados ensaios de PCR descritos na literatura. A nomenclatura utilizada para designar os OI foi alterada de acordo com regras estabelecidas no Laboratório de Virologia Comparada. As

seqüências de nucleotídeos dos OI utilizados, nomenclatura adotada, sua localização no genoma dos vírus BHV-1, BHV-4 e BHV-5, SHV-1, OHV-2, AHV-1 e CHV-2 estão listados na tabela 1.

Para verificar a viabilidade dos DNAs, um controle interno foi usado com OIs que codificam para o gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), altamente conservado em mamíferos (Mikawa et al., 1995) (Tab.1). Este ensaio de PCR foi feito para cada amostra de SNC testada onde foi verificada a amplificação de um fragmento de 225 pb. As amostras com resultado negativo tiveram o DNA extraído novamente até que a amplificação fosse observada.

A metodologia utilizada referente aos ensaios de PCR utilizados para detectar os BHV-1 e BHV-5 foi modificada, com o objetivo de minimizar resultados falso-negativos. De acordo com análises prévias, foi verificado que para amostras brasileiras de BHV-1 e BHV-5 isoladas ao longo de 30 anos no Laboratório de Virologia Comparada, o PCR descrito por VAN ENGELBURG et al. (1993) é bem mais sensível do que outros ensaios de PCRs previamente descritos (Moore et al., 2000, Nadin-Davis et al., 1996, Ros & Belak, 1999). O PCR descrito por Van Engelenburg et al. (1993) amplifica parte de um gene que codifica uma região altamente conservada da glicoproteína B (gB) dos BHV-1 e BHV-5, mas não os diferencia. Com isso, foram utilizados os outros 3 ensaios de PCR que diferenciam os 2 herpesvírus. Vale ressaltar que esses ensaios de PCR adicionais foram utilizados somente para a diferenciação dos BHV-1 e BHV-5. Caso um desses ensaios de PCR não amplificasse, utilizávamos o outro e assim sucessivamente, até a diferenciação dos BHV-1 e BHV-5.

Em cada ensaio de PCR foi utilizado um controle positivo específico para cada tipo de herpesvírus. Além do controle positivo foi utilizado também um controle negativo dos reagentes sem a inclusão da amostra de DNA.

Os controles positivos utilizados nos ensaios de PCR específicos para o BHV-5 foram as amostras EVI-88 e EVI-190, gentilmente fornecidas pelo Dr. Paulo Michel Roehde do

Cada amostra de DNA total extraído foi utilizada como molde em uma reação de amplificação, com volume final de 25 µL contendo: 200 ng de DNA total, 50 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão da enzima Taq DNA Polimerase 10X (50 mM KCl, 20mM MgCl₂, 10 mM TrisHCl - pH.8,3 / Promega – EUA), 10 µmol de cada OI senso positivo e senso negativo (Tab. 1), 5 U/µL de Taq DNA polimerase (Promega, EUA) e água ultra-pura estéril q.s.p. As reações de PCR foram feitas em termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf AG, Hamburg - Germany). As condições dos ciclos dos ensaios de PCR foram feitas de acordo com as referências descritas na tabela 1.

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, órgão da FEPAGRO Saúde (Souza et al., 2002). Para o BHV-1, foram utilizadas as amostras BH53 e BH80 previamente isoladas pelo Dr. Mauricio Resende e caracterizadas pela Dra. Maria Emilia Oliveira no LVC-UFMG (Oliveira et al., 2003).

Nos ensaios de PCR específicos para o OHV-2, os controles positivos utilizados foram as amostras F1, 1423, MG24 e MGA90ca, obtidas de leucócitos do sangue periférico (PBL) de ovelhas e cabras do estado de Minas Gerais, previamente seqüenciadas e disponibilizadas no GenBank com os seguintes números de acesso DQ882652, DQ908954, DQ191408 e EU244696, respectivamente. Estas amostras foram obtidas e caracterizadas no LVC-UFMG pelo Dr. Mauricio Resende.

Como controle positivo nos ensaios de PCR específicos para o SHV-1 foi utilizada a amostra brasileira LA031, previamente isolada e caracterizada no LVC-UFMG pelo Dr. Mauricio Resende (Flatschart & Resende, 2001).

Como não tínhamos disponibilidade de um controle positivo para o BHV-4, a primeira amostra amplificada foi seqüenciada, comprovando a sua identidade com seqüências de BHV-4 disponíveis no GenBank e utilizada como controle positivo nas reações posteriores. Essa amostra foi denominada MGArom recebendo o número de acesso no GenBank: EU244697.

Para verificar a especificidade de cada ensaio de PCR utilizado neste trabalho, todos os controles positivos dos herpesvírus pesquisados foram previamente utilizados como molde em todas as reações de PCR. Nenhuma amplificação de qualquer tipo de herpesvírus não específico nos ensaios de PCR foi visualizada, não ocorrendo, portanto, a amplificação cruzada entre os diferentes tipos de herpesvírus.

A análise dos produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5% (livre de DNase - Invitrogen) em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5 X (89 mM Tris-borato pH 8,3, 25 mM EDTA) à temperatura ambiente sob voltagem constante (100 V) por aproximadamente 1 hora. Em cada canaleta foi aplicado 10 µL de cada produto de PCR homogeneizado com 2 µL de tampão de amostra

(15% de Ficol 400, 0,03% de azul de bromofenol, 0,03% de xileno cianol FF, 0,4% de orange G, 10mM de Tris-HCl pH 7,5). Para determinar o tamanho do produto amplificado foi incluído em cada gel de agarose um marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen) (Sambrook et al., 1989).

Após o fracionamento, os géis de agarose foram corados com brometo de etídeo (1,0 mg/mL) durante 20 minutos e observados em transluminador ultravioleta (254 nm, Pharmacia LKB Macro Vue™, EUA). A identificação e quantificação do tamanho do produto amplificado foram feitos através da comparação visual entre o amplicon e a banda do marcador de tamanho molecular Ladder 100 pb (Invitrogen).

Tabela 1. Informações sobre os oligonucleotídeos iniciadores (OI) utilizados nos ensaios de PCR.

Vírus	OI	gene	SEQÜÊNCIA (5'→3')	Sentido	Produto amplificado	Referências
BHV-1e5	LVC 275	Timidina kinase (PCR)	5'-tggtacggcagccttaagtgg-3'	senso	BHV-5: 273 bp	MOORE et al., 2000
	LVC 276		5'-gttgatctcgcggaggcagta-3'	antisenso	BHV-1: 298 bp	
BHV-1e5	LVC 3	(PCR)	5'-ctgctgtctgtagcccaaacg-3'	senso		VAN ENGELBURG, 1993
	LVC 4		5'-tgtgacttggtgccatgtcgc-3'	antisenso		
BHV-1e5	LVC 219	gB (PCR)	5'-aagtgcacaccgtgtatttggc-3'	senso	BHV-5: 352 pb	NADIN-DAVIS et al., 1996
	LVC 220		5'-ttgcattactttggggtcaaatgtg-3'	antisenso	BHV-1: 308 pb	
BHV-1e5	LVC 310	gC (Semi-nested PCR)	5'-gccgagagmccgcrcgmccgaga-3'	senso		ROS & BELAK, 1999
	LVC 311		5'-ggccacgccagctgcacgtacag-3'	antisenso		
	LVC 312		5'-gcctcgcgctcgcagagcatccac-3'	antisenso		
BHV-4	LVC 85	Timidina kinase (Nested PCR)	5'-gttggcgctcctgtatgtagc-3'	senso	260 pb	EGYED et al., 1996
	LVC 86		5'-atgtatgcccaaaactataatgaccag-3'	antisenso		
	LVC 87		5'-ttgatagtgcgttgggatgtgg-3'	senso		
	LVC 88		5'-cactgcccggtgggaaatagca-3'	antisenso		
OHV-2	LVC 202	Proteína do tegumento (Semi-nested PCR)	5'-agtctgggtatatgaatccagatgctctc-3'	senso	238 pb	BAXTER et al., 1993
	LVC 203		5'-aagataagcaccagttatgcatctgataaa-3'	antisenso		
	LVC 204		5'-ttctgggtagtggcagcgaaggcttc-3'	antisenso		
AHV-1	LVC 205	Proteína do capsídeo (Nested PCR)	5'-tcgtcagtaaaccgctgctggtgc-3'	senso	487 pb	KATZ et al., 1991
	LVC 206		5'-gggaagagactgtctgtacc-3'	antisenso		
	LVC 207		5'-gttgcttaagaacacatccgtgcc-3'	senso		
	LVC 208		5'-gaatggctttgagggcttagat-3'	antisenso		
CHV-2	LVC 303	DNA polimerase (Semi-nested PCR)	5'-cayaaycrtgctactccac-3'	Senso	142 pb	LI et al., 2001
	LVC 304		5'-tggcctcggcagctgctgc-3'	Senso		
	LVC 305		5'-ccgtaatagaggggtcct-3'	antisenso		
SHV-1	P1AA	gG (PCR)	5'-tccacagctcaacaatgaagtggg-3'	senso	262 pb	SCHERBA et al., 1992
	P1AB		5'-tccgaggagcgggacgatacgt-3'	antisenso		

3.3.3. Purificação dos produtos amplificados pela PCR para o sequenciamento

Alguns produtos de PCR foram escolhidos aleatoriamente para o sequenciamento. A purificação dos produtos de PCR foi feita segundo o protocolo descrito por Rosenthal et al. (1993) com algumas modificações. Aos produtos amplificados nos ensaios de PCR foi acrescentado um volume equivalente de solução de polietileno glicol (PEG-8000) 20%, essa

solução após ser homogeneizada por 30 segundos foi incubada a 37°C por 15 minutos, e posteriormente foi centrifugada a 14.000 x g, por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento obtido lavado 2 vezes com etanol 80%, seco a 37°C e suspenso em volume equivalente ao volume inicial da reação de PCR, com água ultra-pura estéril.

Para determinar a eficiência da purificação, 1µL de cada produto purificado foi homogeneizado

com 2 µL de tampão de amostra e em seguida, analisado por separação eletroforética como especificado no item 3.3.2. (Sambrook et al., 1989). Para determinar a quantidade de DNA obtido pela purificação foi incluído em cada gel um marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). A quantificação foi feita através da comparação visual entre os fragmentos amplificados e as bandas do marcador molecular. Nesse marcador, cada banda apresenta uma quantidade de DNA (ng) pré-determinada pelo fabricante. Após ser quantificado o DNA purificado, de cada amostra, foi estocado em freezer a - 20 °C até sua utilização para o seqüenciamento.

3.4. Isolamento dos BHV-1 e 5 e SHV-1

3.4.1. Cultivo celular e Produção Viral

Algumas amostras de SNC de bovinos positivas para os BHV-1, BHV-5 e SHV-1, através dos ensaios de PCR foram escolhidas aleatoriamente para serem isoladas em cultivo celular. Para as amostras de SNC de bovinos positivas para os BHV-1 e BHV-5 foram utilizadas células Madin Darby bovine kidney (MDBK; ATCC CCL-22), uma linhagem contínua de rim bovino e para as amostras de SNC positivas para o SHV-1, células SK6, uma linhagem contínua de rim suíno. Estas amostras foram subcultivadas em várias passagens no Laboratório de Virologia Comparada (LVC) e estocadas em nitrogênio líquido. As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e multiplicadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media – LIFE TECHNOLOGIES, Inc.) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino.

Os fragmentos obtidos de SNC foram homogeneizados com salina 10% (p/v), suplementados com antibiótico e antifúngico (getamicina 100 µg/mL e fungizona 3,0 µg/mL) e clarificados a 2.500 x g, a 4°C, por 20 minutos. Volumes de 200 µL de cada sobrenadante, diluídos em 800 µL de meio DMEM (sem soro fetal bovino) foram incubados por uma hora a 37°C, em estufa úmida, com atmosfera de 5% de CO₂ (Schmidt, 1979) em monocamadas de MDBK ou SK6, em placas de 24 cavidades. Leituras diárias foram realizadas, com auxílio de um microscópio óptico invertido com contraste de fase, para visualização de efeito citopático (CPE). Após a observação de 90% do CPE, o sobrenadante da cultura, contendo o vírus, foi coletado e clarificado por centrifugação a 1000 x g por 20 minutos (Liang et al., 1991). As amostras que apresentaram ECP foram purificadas em placa, tituladas segundo o protocolo descrito por Dulbecco & Vogt (1954)

e Reed & Munch (1938) e submetidas a ensaios de PCR para identificação viral.

3.4.2. Titulação dos isolados de BHV-1, BHV-5 e SHV-1

Os isolados virais foram titulados submetendo-se a diluições decimais seriadas até a diluição de 10⁻⁹ e inoculando-se quatro poços de uma placa de 96 poços contendo monocamada de cultivo de células MDBK com cada diluição. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até o momento da leitura ao microscópio, após 72 horas. Os títulos foram calculados pelo método de Reed & Munch (1938) e as amostras que apresentaram títulos a partir de 10⁴ foram utilizadas nos procedimentos posteriores.

3.4.3. Identificação viral através da PCR

O meio de cultura obtido das garrafas com cultivos celulares foi clarificado por centrifugação a 900 x g por 10 minutos com objetivo de se obter vírus extracelular, conforme descrito por Celedón et al. (1994). Os vírus associados às células foram obtidos por 3 ciclos de congelamento-descongelamento das células remanescentes, seguido de centrifugação a 10000 x g por 30 min para remoção dos debris celulares. O sedimento viral foi obtido por tratamento com polietilenoglicol. A solução foi incubada por 12 a 14 horas a 4 °C, centrifugada a 10000 x g por 30 min e dissolvida em 3 mL de PBS (0,01M) pH 7,2 (Sambrook et al., 1989). A extração do DNA, sua quantificação e a PCR foram realizados conforme descritos no item 3.3.2.

3.5. Seqüenciamento

Os seqüenciamentos dos fragmentos de DNA escolhidos aleatoriamente foram feitos no Laboratório de Evolução e Diversidade Molecular no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), utilizando o seqüenciador automático Megabace™ 1000 (Amersham Bioscience) e os reagentes do Kit DyEnamic™ ET Dye Terminator (Amersham Bioscience) de acordo com instruções do fabricante.

Os fragmentos de DNA amplificados foram seqüenciados pelo método da terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1997) em ambas as direções da dupla fita, no mínimo três vezes, empregando-se os oligonucleotídeos, senso e anti-senso, específicos que foram utilizados nos ensaios de PCR, anteriormente descritos. Quando não foi possível a sobreposição de seqüências estendidas em

direções opostas ou quando estas não apresentaram alta variabilidade de bases, o seqüenciamento unidirecional foi repetido.

3.6. Análise computacional das seqüências

Os eletroferogramas gerados para cada uma das seqüências de nucleotídeos, senso positivo e senso negativo de cada amostra foram submetidos ao BLASTn, através do programa Chromas[®] versão 2.23 (1998-2002-Technelsysium Pty LTD-<http://www.technelsysium.com.au/chromas.html>), para confirmação do seqüenciamento. Para analisar a qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas foram utilizados o programa PHRED (<http://adenina.biomol.unb.br/phph/index.html>), o qual aceita como critério de validação de qualidade somente as leituras que tenham pontuação de no mínimo 20 (Ewing & Green, 1998).

As seqüências de nucleotídeos obtidas dos fragmentos de DNA foram editadas para a remoção dos oligonucleotídeos iniciadores, além da possível resolução de ambigüidades. A seqüência consenso final de cada amostra foi obtida a partir das seqüências senso e do reverso complementar das seqüências anti-senso, alinhadas pelo método do CLUSTAL/W, com o programa BioEdit (© 1997-2005 versão 5.09 - <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

Em seguida, as seqüências de nucleotídeos consenso obtidas foram comparadas com outras seqüências de herpesvírus previamente disponíveis no banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI - Bethesda-USA - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os algoritmos BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) do pacote BLAST 2.0 (Basic Alignment Search Tool) desenvolvido pelo NCBI foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos (Altschul et al., 1997). Só foram considerados genes com similaridade significativa com as seqüências do banco de

dados àqueles que demonstraram valores de corte (score) maior que 200, valor de E menor que 0,005 ou um valor de E menor que 10^{-5} , independentemente do valor de corte.

A tradução das seqüências nucleotídicas foi feita nas seis fases de leitura, utilizando o programa Translate (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). O algoritmo BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizado para a busca de similaridade entre as seqüências de aminoácidos inferidas e as seqüências previamente disponíveis no GenBank.

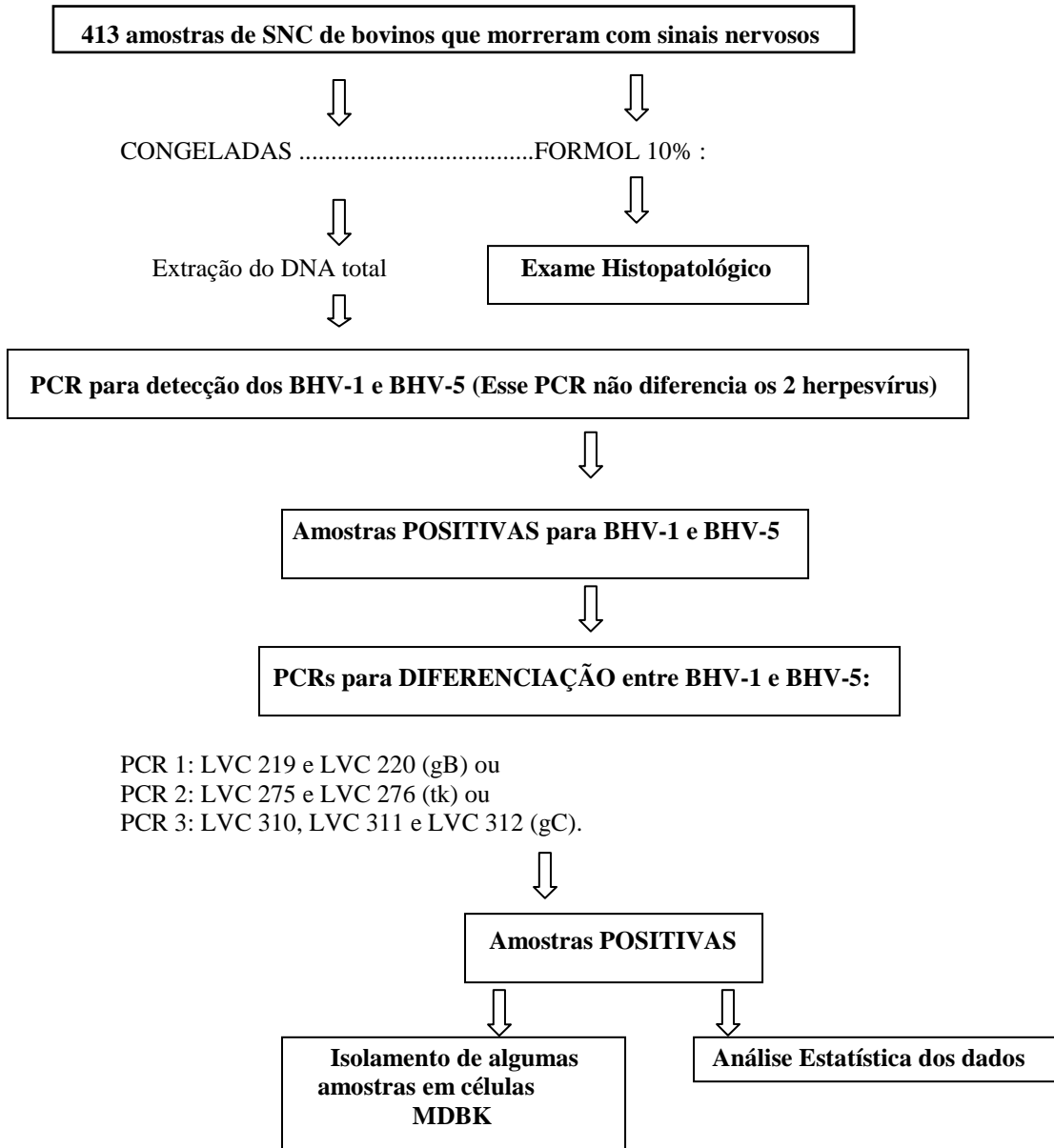
3.7. Análises Estatísticas

As amostras selecionadas para o estudo não foram escolhidas aleatoriamente, mas representam um subsítio de amostras associadas com encefalites que foram relatadas em Minas Gerais em um período de 16 meses. Considerando o processo de amostragem, estes dados podem sugerir uma estimativa da ocorrência de encefalites por herpesvírus em Minas Gerais. Para comparações entre variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher (Triola 1998). Com o intuito de averiguar a existência de diferença de locação entre os tipos de amostragens quantitativas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Lehmann et al. 1975). O P valor < 0.05 foi considerado significativo e calculado através de Simulações de Monte Carlo, no software SPSS 15.0.

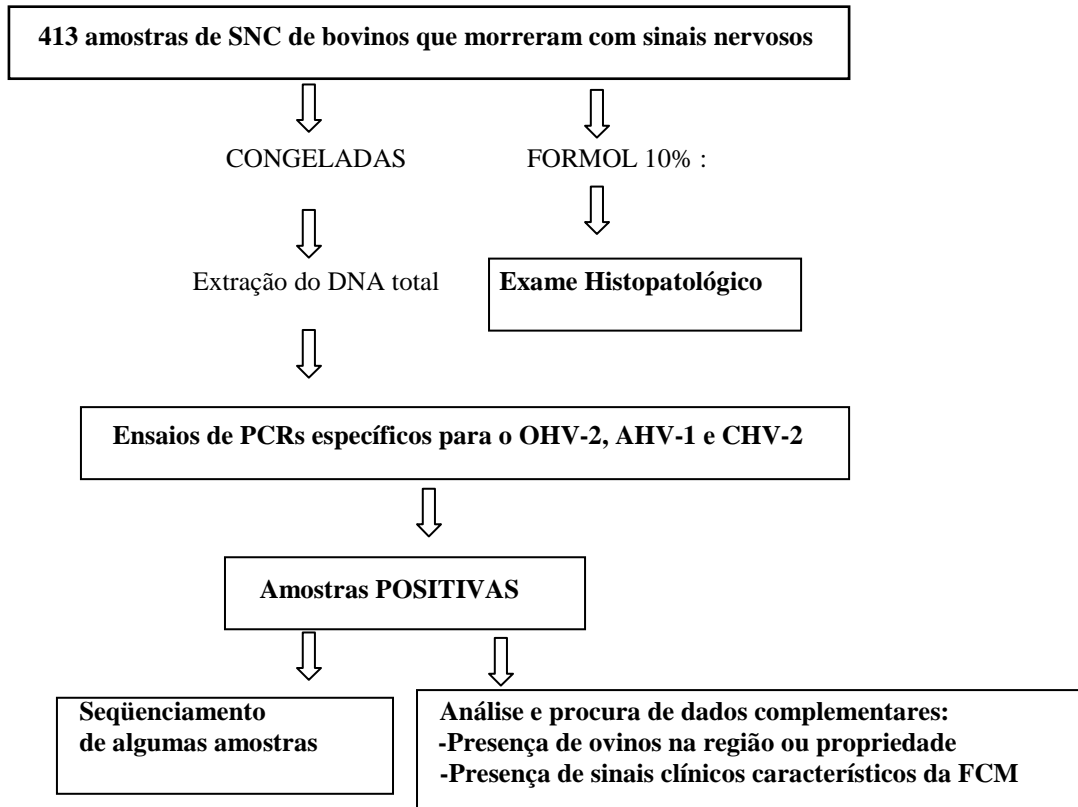
3.8. Esquemas da metodologia empregada para o diagnóstico de cada um dos herpesvírus pesquisados.

Toda a metodologia utilizada para o estudo dos herpesvírus foi relatada. Entretanto, pequenas modificações foram feitas em alguns dos itens referentes à metodologia geral, de acordo com a necessidade do diagnóstico de cada herpesvírus. Os métodos de diagnósticos empregados para cada tipo de herpesvírus foram relatados em forma de esquema.

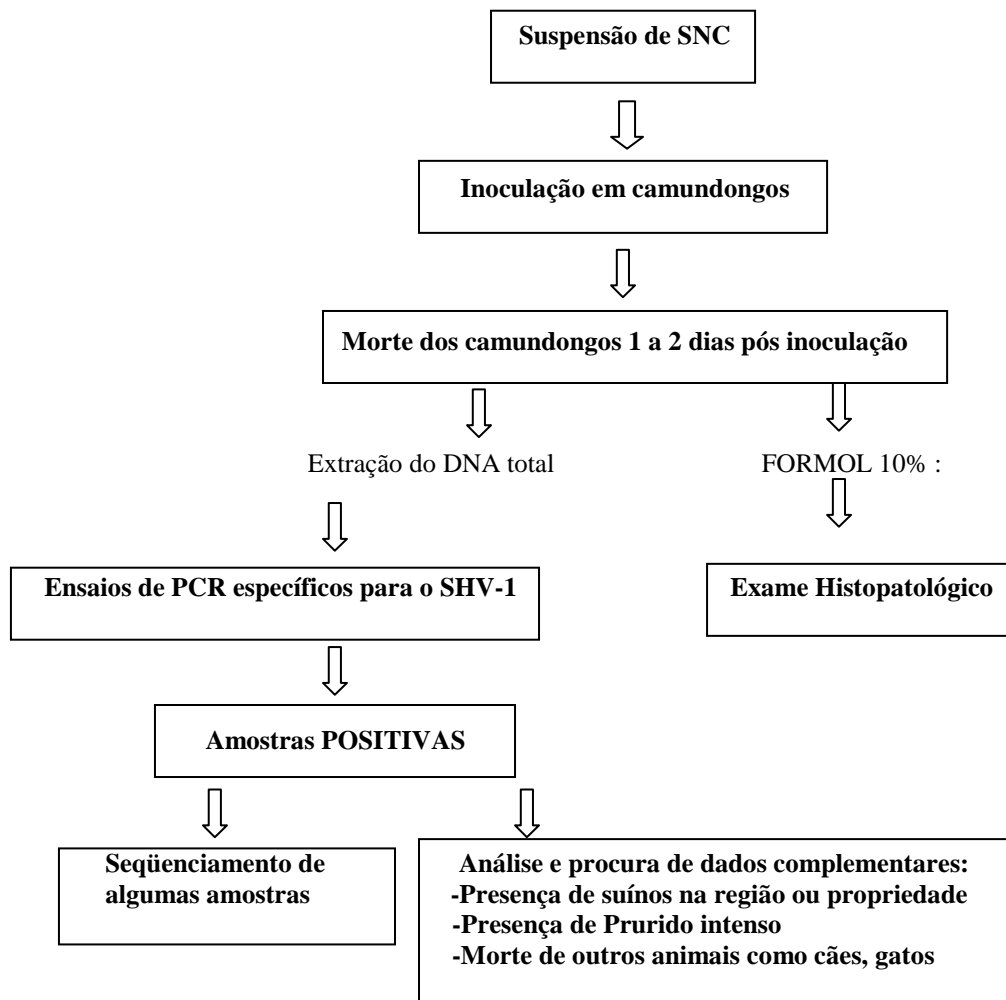
3.8.1. Esquema da metodologia empregada para os BHV-1 e BHV-5



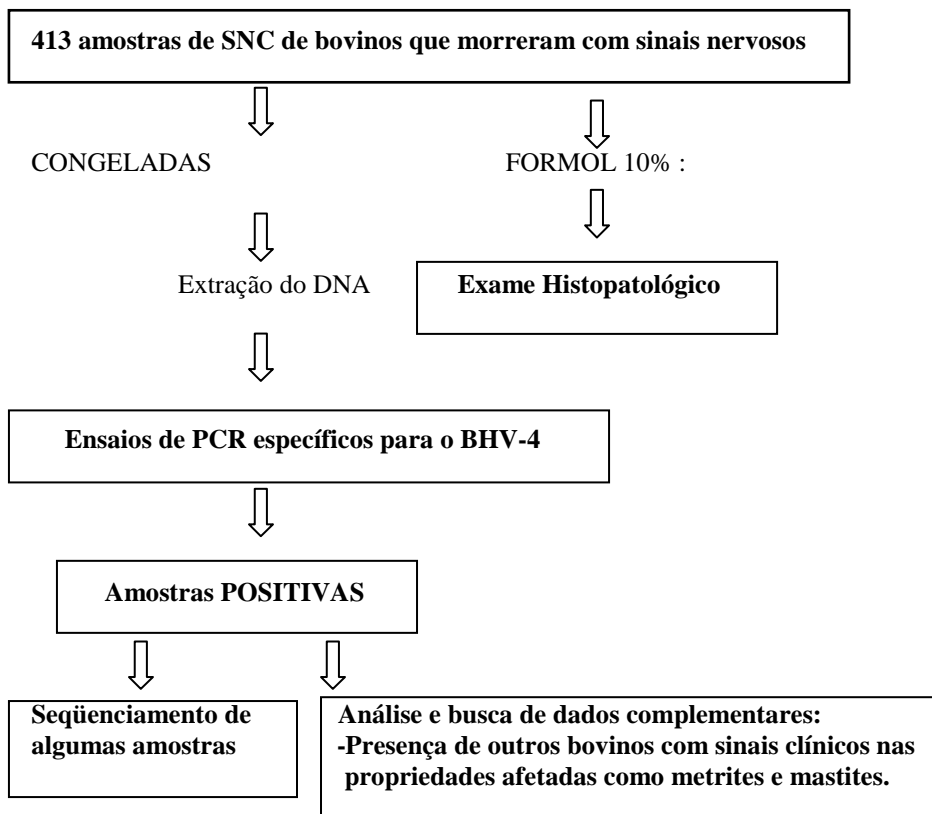
3.8.2. Esquema da metodologia empregada para os agentes da Febre Catarral Maligna: OHV-2, AHV-1, CHV-2



3.8.3. Esquema da metodologia empregada para o SHV-1 (VDA)



3.8.4. Esquema da metodologia empregada para o BHV-4



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da presença dos BHV-1 e BHV-5 nas amostras de SNC dos bovinos pesquisados

4.1.1. Ensaios de PCR

Dentre as 413 amostras de SNC de bovinos que morreram com sinais nervosos, 188 (45,5%) foram positivas para os BHV-5 e somente uma amostra foi positiva para o BHV-1. Todas as amostras positivas para os BHV-1 e BHV-5 amplificaram um fragmento específico de 176 pb (gC) que, neste caso, não os diferencia. A diferenciação foi feita através do tamanho dos fragmentos amplificados de amostras de BHV-1 e BHV-5, nos 3 ensaios de PCR adicionais, quando necessário de acordo com o item 3.3.2. Caso a diferenciação fosse feita com somente um destes PCRs adicionais, os outros 2 não eram utilizados.

4.1.2. Epidemiologia

De acordo com as informações catalogadas nos relatórios enviados juntamente com os materiais coletados e informações adicionais obtidas diretamente com os proprietários e veterinários responsáveis, foram feitas análises estatísticas de alguns dados epidemiológicos associados aos bovinos que morreram com sinais nervosos, diagnosticados positivos e negativos para os BHV-1 e BHV-5. Para facilitar as análises, os animais positivos para os BHV-1 e BHV-5 foram agrupados em um único grupo, denominado herpesvírus bovinos encefálicos (BHE).

As amostras de SNC dos bovinos pesquisados foram provenientes de 173 municípios de Minas Gerais, sendo que 106 municípios (61,2%) apresentaram amostras positivas para os BHE. Destes, a maioria, 62 (58,5%) apresentou somente um caso positivo por município. Como a amostragem poderia ser de demanda, quando há o acometimento e morte de mais de um animal na propriedade e somente o material proveniente de um animal é enviado para análises laboratoriais, os dados referentes à quantidade de animais doentes e mortos nas propriedades com animais positivos para os BHE foram obtidos com os proprietários e veterinários responsáveis. A prevalência estimada dos BHE na população de bovinos pesquisada foi de 45,8% (Intervalo de Confiança a 95% = [40,9%-50,6%]).

A maioria dos casos de BHE ocorreu de forma espaçada acometendo municípios de todas as regiões administrativas de Minas Gerais, com maior ocorrência nas regiões Central e Sul. A taxa de positividade dos BHE entre as regiões analisadas variou de 34,4 a 71,4%, sendo a maior taxa encontrada na região Norte. Entretanto, o maior número de amostras recebidas para a pesquisa dos BHE originou-se da região Central.

Os municípios que registraram os maiores números de casos de BHE foram Carmo do Rio Claro (região Sul), Pitangui e Serra Azul de Minas (região Central) com 6 casos por município e Uberaba (Triângulo) com 11 casos positivos em 17 submissões. A figura 2 mostra a distribuição geográfica dos casos de BHE por região analisada neste estudo

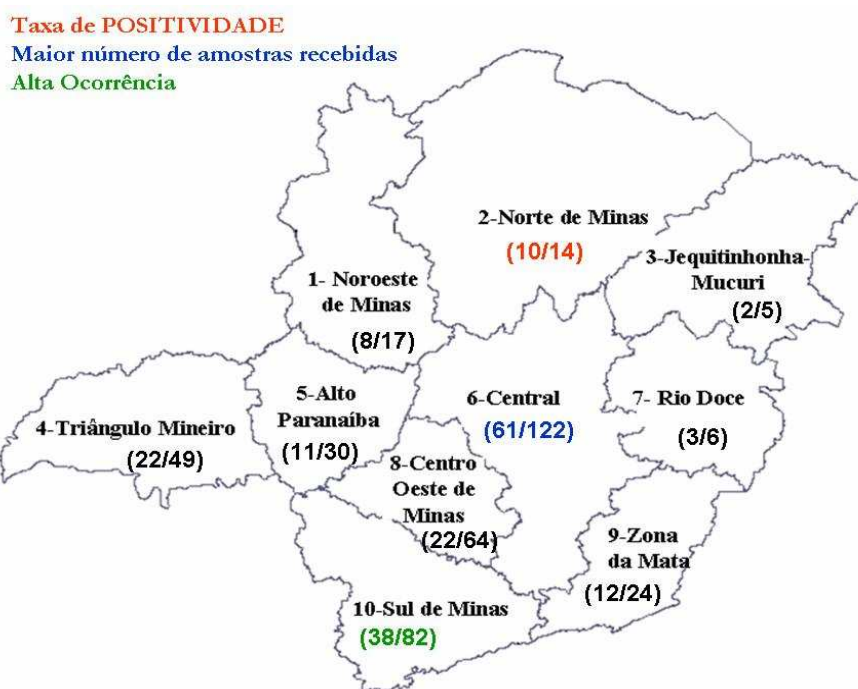


Figura 2. Distribuição geográfica por região dos casos de BHE no estado de Minas Gerais. O numerados indica o número de casos de BHE e o denominador, o número de amostras recebidas.

Os casos de BHE ocorreram durante todos os meses do ano sem nenhum agrupamento sazonal. Os meses com maior número de casos de BHV-5 foram março, janeiro, novembro, maio e dezembro com 20, 19, 17 e 16 e 16 casos, respectivamente.

De acordo com os dados fornecidos pelos veterinários e proprietários, a maioria dos casos de BHE apresentou uma forma isolada, com o acometimento de um único animal por propriedade, sendo que em 12 propriedades, o

número de animais afetados variou de 2 a 9 casos. Bovinos de diversas raças e ambos os sexos foram afetados, sem predisposição para a infecção pelos BHE (Tab. 2).

A idade dos animais afetados variou de 2 meses a 18 anos, com uma concentração dos casos entre animais com idade menor que 1 a 6 anos (87,8%). Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre as idades dos bovinos infectados ou não pelos BHE (P valor =0,531) (Tab. 2).

Tabela 2. Correlação entre a distribuição por sexo, idade e raça dos bovinos que apresentaram sinais nervosos pesquisados e positivos para os BHE.

Descrição	No. de pesquisados	animais	No. de animais positivos para BHE	P valor
Sexo				0.673 ^{FT}
F	279		130	
M	134		59	
Idade (anos)				0.531 ^{MW}
<= 1	106		57	
2 a 4	186		75	
5 a 7	75		38	
8 a 18	46		19	
Aptidão				0.156 ^{FT}
Leite	290		138	
Corte	92		45	
Ambos	9		4	

FT – Teste Exato de Fisher; MW – Teste de Mann-Whitney

Os bovinos BHE-positivos apresentaram um quadro clínico que variou de 1 a 22 dias desde o início dos sinais clínicos, com evolução da maioria dos casos (92,1%) ocorrendo entre 1 a 6 dias. Estatisticamente, não houve associação entre a evolução do quadro clínico dos bovinos infectados ou não pelos BHE (P valor =0,409 – Mann-Whitney).

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos foram descritos em ordem decrescente de frequência e estão apresentados na Tabela 3.

Houve uma associação estatisticamente significativa (P<0.05) entre a presença dos BHE e os seguintes sinais clínicos: depressão, incapacidade de se levantar, fraqueza muscular, tremores musculares, paralisia dos membros posteriores, nistagmo e convulsões (Tab. 3).

A maioria dos bovinos BHE-positivos exibiu sinais nervosos, entretanto, em 4 animais, também foram observados sinais respiratórios como respiração ofegante, tosse, corrimento nasal, dispnéia e edema pulmonar.

Tabela 3. Ocorrência dos sinais clínicos apresentados pelos bovinos pesquisados, em ordem de frequência.

Sinais clínicos	No. de bovinos	No. de bovinos	P Value
	pesquisados	BHE-positivos	
Incoordenação	262	125	0.307 ^{FT}
Decúbito	198	94	0.553 ^{FT}
Depressão	132	83	< 0.001 ^{FT}
Incapacidade de se levantar	155	82	0.025 ^{FT}
Fraqueza muscular	101	78	< 0.001 ^{FT}
Opistótono	94	51	0.077 ^{FT}
Sialorréia	120	56	0.828 ^{FT}
Movimentos de pedalagem	94	50	0.125 ^{FT}
Paralisia total	91	43	0.812 ^{FT}
Tremores	62	40	0.001 ^{FT}
Anorexia	66	36	0.138 ^{FT}
Paralisia dos membros posteriores	40	33	< 0.001 ^{FT}
Nistagmo	50	30	0.035 ^{FT}
Convulsões	31	24	< 0.001 ^{FT}
Instabilidade dos membros posteriores	39	23	0.092 ^{FT}
Cegueira	28	14	0.697 ^{FT}
Ranger de dentes	16	11	0.074 ^{FT}
Andar em círculos	9	4	1.00 ^{FT}

FT – Teste Exato de Fisher - (P<0.05)

4.1.3. Achados macro e microscópicos no SNC

A avaliação macroscópica do encéfalo dos bovinos positivos para o BHV-5, em sua maioria, não revelou alterações significativas. Em casos menos frequentes havia hiperemia difusa (mais evidente nas porções craniais), edema, hemorragias multifocais e áreas de malácia na superfície de corte.

A avaliação histopatológica do encéfalo, em todos os casos, revelou um quadro de

meningoencefalite linfocitocitária, aguda, multifocal a difusa e discreta a intensa (Fig 3A,B). Em 70,2% dos casos, foi observada uma polioencefalomalácia (necrose cerebrocortical), multifocal, principalmente no córtex frontal. Hemorragias multifocais foram frequentemente visualizadas. Somente em três casos foram visualizados corpúsculos de inclusão intranucleares em neurônios e astrócitos (Fig. 3C,D).

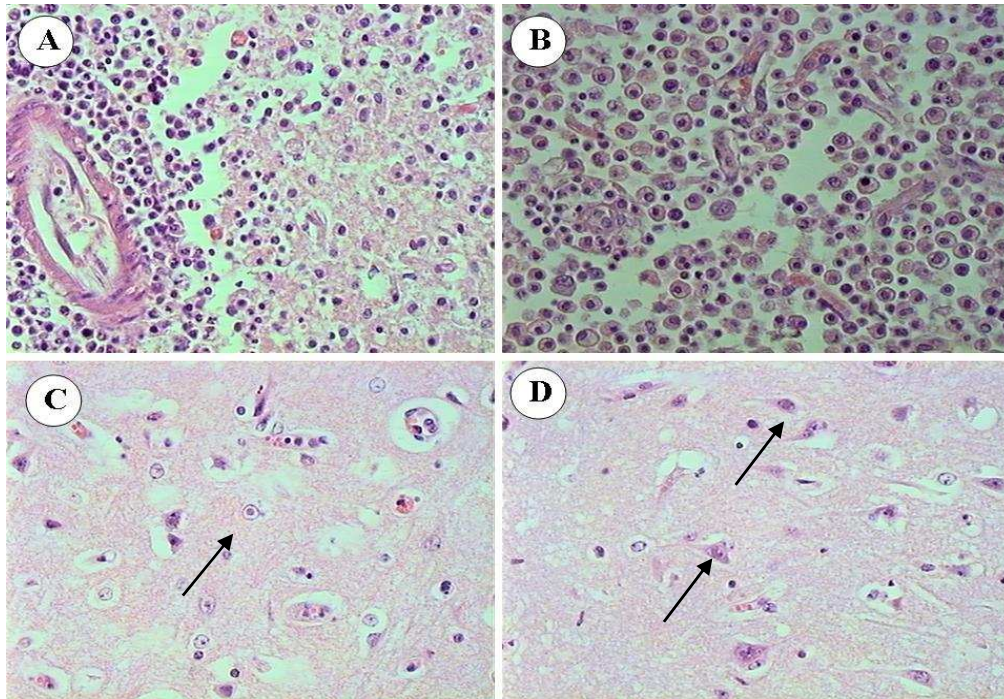


Figura 3. Encéfalo de um bovino com meningoencefalite pelo BHV-5. A: Manguito perivascular linfohistiocitário, intenso (à esquerda) e malacia moderada com substituição do neurópilo por células “Gitter” na meningoencefalite por BHV-5. Cérebro, HE, objetiva 40. B: Malacia acentuada com substituição do neurópilo por células “Gitter” na meningoencefalite por BHV-5. Cérebro, HE, objetiva 40. C: Corpúsculo de inclusão intranuclear, eosinofílico, em astrócito (seta) na meningoencefalite por BHV-5. Cérebro, HE, objetiva 40. D: Corpúsculos de inclusão intranucleares, eosinofílicos, em neurônios (setas) na meningoencefalite por BHV-5. Cérebro, HE, objetiva 40.

4.1.4. Multiplicação viral em células MDBK

Fragmentos do SNC de 11 bovinos positivos para o BHV-5 escolhidos aleatoriamente foram inoculados em monocamadas de células MDBK para o isolamento viral. Em todos os cultivos

constatou-se o efeito citopático (ECP) característico dos herpesvírus após aproximadamente a 4ª sub-passagem (Fig. 4). A confirmação do isolamento viral foi feito através de ensaios de PCR.

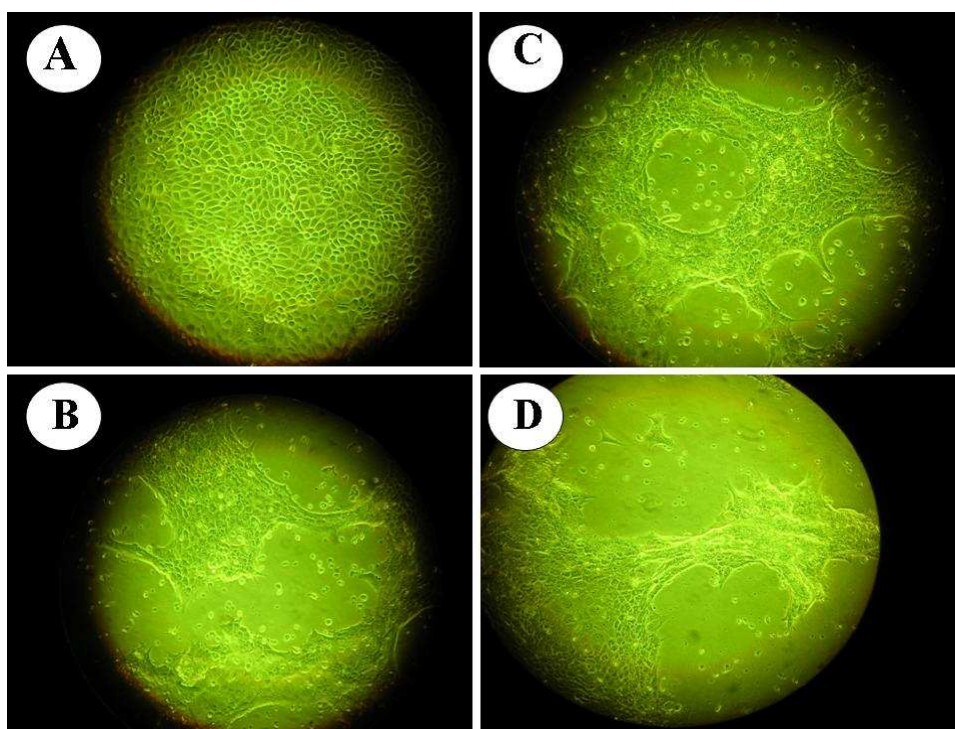


Figura 4. Efeito citopático (ECP) causado pelo isolado de BHV-5 MGA1252 em células MDBK. As células foram infectadas em garrafas A25 e fotografadas após 4ª sub-passage. As células foram fotografadas em microscópio invertido *Olympus IM 103541* (Japão), câmera digital *Olympus D-540 ZOOM*, 3.2 Megapixel (Japão). **A:** Células MDBK controle – não infectadas com o BHV-5. **B,C,D:** Observação do ECP provocado pelo isolado de BHV-5, MGA1252. Pode-se perceber um arredondamento celular, agrupamento de células arredondadas em forma de “cacho de uva”, prolongamento das células infectadas e vacuolização da camada celular. Na foto D observamos formação de sincícios, em um pequeno grupo de células (à esquerda da foto).

4.1.5. Discussão

A seleção da amostragem dos bovinos analisados neste trabalho não ocorreu aleatoriamente, mas representou uma população de bovinos que morreu com algum tipo de sinal nervoso, durante um período de 16 meses, em várias regiões de Minas Gerais. Durante o período avaliado, os casos de BHV-5 foram observados em todos os meses, sem um agrupamento sazonal. Considerando o processo de amostragem, os resultados obtidos proporcionam uma estimativa sensata da ocorrência de encefalites pelo BHV-5 em Minas Gerais.

Os dados obtidos neste trabalho revelaram que o BHV-5 está distribuído por todo o Estado de Minas Gerais apresentando um considerável acréscimo de sua ocorrência. Além disso, também foi observado que a encefalite não-supurativa causada pelo BHV-5 em bovinos pareceu ser mais alta em Minas Gerais (45,5%-188/413) do que em outras regiões do Brasil e de outros países como Argentina e Austrália

(Carrillo et al., 1983; Salvador et al., 1998; Sanches et al., 2000). Este aparente aumento da ocorrência de casos de BHV-5 poderia estar associado com a amostragem estudada. Neste caso, além da grande quantidade de amostras analisadas, foram avaliados vários casos isolados oriundos de diversas regiões do estado, não sendo pesquisados somente surtos isolados. De acordo com Goehring et al. (2005), surtos de encefalites herpéticas são diagnosticados com maior facilidade, mas acredita-se que são mais raros do que os casos isolados.

Em sua maioria, os relatos de encefalites pelo BHV-5 são restritos a um número pequeno de casos ou surtos (Colodel et al., 2002; Salvador et al., 1998). Em Minas Gerais e em outros países como a Austrália, os casos descritos foram provenientes de pequenas amostragens oriundas de uma mesma região geográfica ou relato de um único caso (Hill et al., 1984; Gomes et al., 2002; Aquino Neto, 2005). Nos Estados do Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, a amostragem foi maior, sendo descritos de 7 a 15

surtos, com morte pelo BHV-5 de até 50 bovinos (Salvador et al., 1998; Rissi et al., 2006).

Um outro fator que poderia ter auxiliado no aumento do número de casos de BHV-5 encontrado neste estudo, seria a amplificação de diferentes regiões do genoma viral, utilizando-se 4 ensaios de PCR distintos, aumentando a sensibilidade do diagnóstico. Estudos prévios feitos no LVC demonstraram que ensaios de PCR que amplificam regiões muito conservadas dos BHV-1 e BHV-5 são mais sensíveis, apesar de não diferencia-los. A diferenciação, portanto, é feita através de ensaios de PCR adicionais que amplificam regiões menos conservadas do genoma de ambos os herpesvírus, diferenciando-os através do tamanho do produto amplificado ou da ausência da amplificação de um deles. Às vezes, para a diferenciação, é necessária a utilização de mais de 3 ensaios de PCR adicionais, por serem menos sensíveis. Portanto, apesar deste procedimento ser mais laborioso, diminui a probabilidade de resultados falso-negativos. Dentre os ensaios de PCR testados, o mais sensível foi o descrito por Van Engelenburg (1993), que amplifica parte de uma região conservada da gC.

Todos os animais estudados apresentaram achados histopatológicos característicos de infecção pelo BHV-5, evidenciados por uma meningoencefalite linfocitocitária aguda e alterações circulatórias como hiperemia, hemorragia e edema. Achados como necrose cerebrocortical ocorreu na maioria dos casos (132/188 – 70,2%) e corpúsculos de inclusão intranuclear em astrócitos e neurônios foram encontrados com menos frequência, em somente 3 casos. A presença de corpúsculos de inclusão intranuclear em astrócitos e neurônios são difíceis de encontrar, apesar de ser considerado um achado definitivo para o diagnóstico histopatológico de meningoencefalite pelo BHV-5 (Claus et al., 2002; Rissi et al., 2007). Entretanto, alguns autores relatam que é mais frequente em materiais bem conservados (Rissi et al., 2006). Como na maioria dos casos o encéfalo não estava bem conservado, a consideração da presença ou não de corpúsculos de inclusão intranuclear para confirmação ou eliminação do diagnóstico de meningoencefalite pelo BHV-5 não foi confiável. Em relação à necrose cerebrocortical (malácia), apesar de ser descrito com frequência no Brasil, não pudemos confirmá-la em todos os casos, apesar de ter sido frequente. Há controvérsias quanto a sua presença e a confirmação de casos de meningoencefalite pelo BHV-5 em diferentes países. Esse achado tem sido descrito na maioria dos encéfalos dos bovinos afetados pelo BHV-5

no Brasil, Canadá, Uruguai, Argentina sendo que em outros países como Austrália, América do Norte e alguns países da Europa sua presença até agora não foi descrita (Rissi et al., 2006).

Apesar dos achados histopatológicos característicos de meningoencefalite pelo BHV-5 estarem de acordo com outros relatos da doença, detalhes sobre a caracterização do tipo e intensidade da distribuição das lesões encefálicas de cada bovino analisado foram prejudicados. Parte do material remetido pelos veterinários de campo no formol, para os exames histopatológicos, não foi coletado de maneira adequada. Para este estudo detalhado, os encéfalos teriam que ser coletados inteiros e fixados em formol a 10% (Elias et al., 2004).

A ocorrência de casos isolados de BHV-5, juntamente com a falta de laboratórios envolvidos na realização de um diagnóstico neurológico em bovinos, pode ter contribuído para que casos da doença sejam sub-diagnosticados, em Minas Gerais. Apesar dos primeiros casos de BHV-5 terem sido diagnosticados em 2000, desde 1989, pesquisas sorológicas envolvendo o BHV-1 têm revelado que sua prevalência no Estado de Minas Gerais é alta, com aproximadamente 58,2% dos bovinos soropositivos e 93,4% dos municípios acometidos (Anuniação et al., 1989; Rocha et al., 2001; Gomes et al., 2002). Entretanto, devido à ocorrência de reações cruzadas entre o BHV-1 e o BHV-5 em testes sorológicos, é provável que os animais supostamente infectados com o BHV-1 poderiam estar infectados com o BHV-5 (Claus et al., 2002).

Animais mais velhos foram acometidos pelo BHV-5, com 87,8% dos casos variando entre 1 a 6 anos de idade, enquanto outros trabalhos sugerem que animais mais novos são os preferencialmente infectados (Rissi et al., 2006; 2007). Entretanto, uma das características observadas em um trabalho onde foram detectados 3 casos de BHV-5 em Minas Gerais durante o ano de 2000, foi o acometimento de animais mais velhos, entre 3 a 6 anos de idade (Gomes et al., 2002). As razões para isso não estão esclarecidas, mas podem estar relacionadas com fatores ambientais, mudanças no manejo ou pelo fato de amostras de SNC de animais novos, que morrem com sinais nervosos, não serem submetidos, com frequência, para análise ao IMA. Isso pode ocorrer devido a ampla variedade de agentes causadores de encefalites em animais jovens (1 a 7 meses de idade), fazendo com que o diagnóstico de raiva, que é feito pelo IMA, seja ignorado, tornando-se um gasto a mais pelo proprietário.

Neste trabalho, o BHV-1 foi detectado no SNC de um bovino que apresentou um quadro de meningoencefalite similar aos relatados nos bovinos infectados com o BHV-5. No entanto, encefalites em bovinos causadas pelo BHV-1 são raras. Embora 5 amostras de BHV-1 tenham sido isoladas do SNC de bovinos que apresentaram doença neurológica, no Rio Grande do Sul, um quadro de encefalite não foi observado em 3 destes casos (Silva, 2007). Contudo, o envolvimento do BHV-1 em doenças neurológicas de bovinos pode ser mais freqüente do que os casos previamente relatados, já que existem pesquisas onde o diagnóstico de meningoencefalite pelo BHV-5 é feito somente com as observações histopatológicas do encéfalo, sem a realização de um teste capaz de diferenciá-los (Elias et al., 2004).

A maioria dos sinais nervosos associados com casos de encefalite pelo BHV-5 descritos na literatura como incoordenação, decúbito, tremores, opstótono, e depressão foram encontrados nos bovinos pesquisados (Claus et al., 2002, Rissi et al., 2006; 2007). Contudo, alguns sinais clínicos incomuns em casos de BHV-5, como fraqueza muscular e paralisia dos membros posteriores foram observados, apresentando uma associação estatisticamente significativa. É importante notar que já foram relatados dois casos de paralisia dos membros posteriores causados pelo BHV-5 em bovinos infectados naturalmente pelo BHV-5 no Estado de Minas Gerais, confirmando o achado (Gomes et al., 2002; Aquino Neto, 2005). Sinais clínicos como ranger de dentes e paralisia da língua, comuns em casos de BHV-5, foram raramente citados pelos veterinários de campo. Isso pode ter ocorrido pela maior dificuldade de observação detalhada dos sinais clínicos, principalmente em propriedades com grandes extensões de terra, como sugerido por Salvador et al. (1998).

O diagnóstico de BHV-5 em 45,5% dos casos de encefalite em bovinos, previamente diagnosticados negativos para o vírus da raiva, em Minas Gerais, comprova a necessidade de se realizar exames laboratoriais para o diagnóstico diferencial de enfermidades que acometem o SNC de bovinos e alertar as autoridades sanitárias para a importância do BHV-5, não somente no estado, mas no Brasil.

4.2. Estudo da presença dos OHV-2, AHV-1 e CHV-2, agentes da febre catarral maligna, nas amostras de SNC dos bovinos pesquisados

4.2.1. Ensaios de PCR

Dentre as 413 amostras de SNC de bovinos que apresentaram sinais nervosos ao morrer, 17 (4.1%) foram positivas para o OHV-2. Todas as amostras positivas para o OHV-2 amplificaram um fragmento específico de 238 pb. Não houve detecção dos outros vírus do grupo da FCM pesquisados (AHV-1 e CHV-2).

Em 8 das 17 amostras de SNC positivas para o OHV-2, o BHV-5 também foi detectado através de ensaios de PCR citados anteriormente, no item 4.1.1. Portanto, das 188 amostras positivas para o BHV-5, 8 apresentaram co-infecção com o OHV-2.

4.2.2. Seqüenciamento

Das 17 amostras positivas, 5 foram seqüenciadas a partir do produto obtido por PCR purificado. As seqüências editadas foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e receberam os seguintes números de acesso: DQ875142 (683), DQ875143 (1192), DQ875144 (1236), DQ875145 (1322), DQ875146 (1436). Essas seqüências de nucleotídeos foram, então, comparadas com seqüências de nucleotídeos do genoma do OHV-2 que codificam parte da proteína do tegumento disponíveis no GenBank para avaliação da identidade, através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* – BLASTN. O resultado da comparação demonstrou que, para esta região genômica, as seqüências de nucleotídeos apresentaram um grau de similaridade entre 83-92%. Além disso, as seqüências de OHV-2 obtidas neste trabalho codificam para uma proteína do tegumento não funcional devido a mutações. Este dado também foi observado em seqüências de nucleotídeos homólogas das amostras indianas Ind-3342 (DQ229934), Ind-4625 (DQ229935), Ind-4476 (DQ229936), Ind-4497 (DQ229937), Ind-2532 (DQ229939) disponíveis no GenBank.

4.2.3. Achados histopatológicos no SNC

A avaliação histopatológica do encéfalo de 4 bovinos positivos para o OHV-2 revelou alterações inflamatórias e vasculares discretas (Fig. 5 C,D). Como a suspeita inicial dos veterinários de campo foi direcionada para o vírus rábico, somente o SNC dos bovinos que morreram com sinais nervosos foi coletado. Entretanto, a *rete mirabile* carotídea foi coletada de um único animal. Um infiltrado linfocitário, também discreto associado a alguns neutrófilos e fibrina na túnica adventícia dos vasos da *rete mirabile* carotídea foram encontrados, sugestivo de FCM (Fig. 5 A,B).

Em outros 8 casos, a avaliação histopatológica do encéfalo revelou um quadro de meningoencefalite linfohistiocitária difusa com necrose cerebrocortical e hemorragias multifocais. Apesar da presença de alterações inflamatórias, não foram observados uma vasculite e degeneração fibrinóide.

Em outros 4 casos, as alterações no encéfalo foram consideradas inespecíficas. Os achados se restringiram a hiperemia e hemorragias

multifocais, hemorragia de meninges, gliose e neuronofagia, neurônios e Células de Purkinge retraídos e escurecidos, sem evidências de reação vascular de cunho inflamatório.

No caso restante, a presença de estruturas similares a hematozoários nos pequenos vasos, juntamente com hiperemia cerebral, hemorragias de meninges, hemólise intravascular e hemossiderose levaram a um diagnóstico histopatológico de Babesiose cerebral.

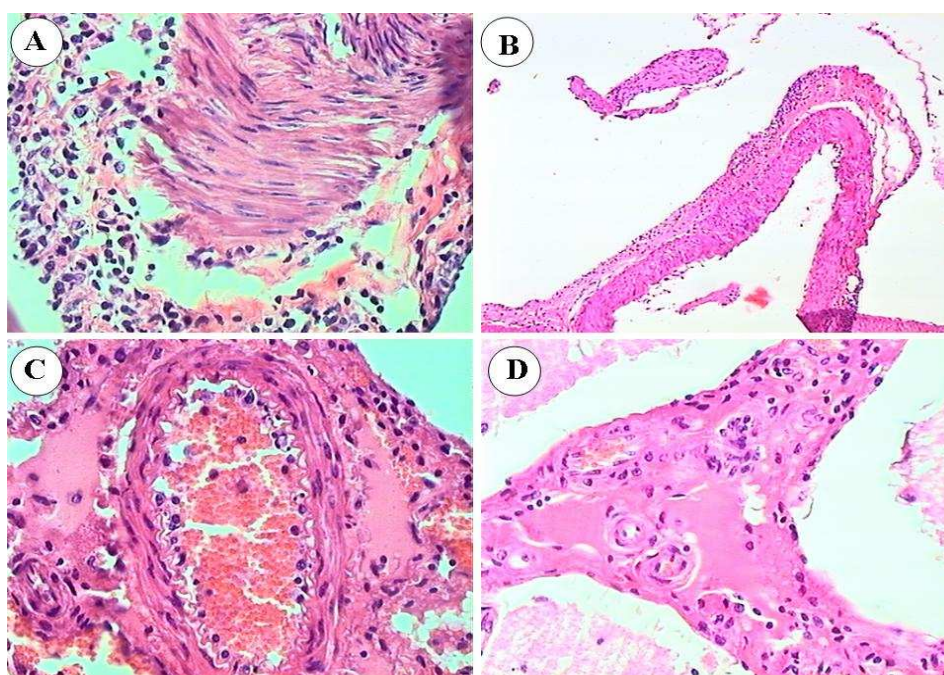


Figura 5. Exame histopatológico da *rete mirabile* carotídea e cerebelo de bovinos com diagnóstico positivo para o OHV-2. **A,B:** Exame histopatológico da *rete mirabile* carotídea. Apesar da presença de uma vasculite discreta, o diagnóstico de FCM foi confirmado. **A:** Infiltrado inflamatório linfohistiocitário, intenso na túnica adventícia (vasculite) e espaço perivascular na *rete mirabile* carotídea, HE, objetiva 40. **B:** Vasculite linfohistiocitária, discreta, na *rete mirabile* carotídea, HE, objetiva 40. **C,D:** Exame histopatológico do cerebelo de um bovino que morreu com sinais nervosos e PCR positivo para OHV-2 no SNC. **C:** Meningite com infiltrado de células mononucleares principalmente na túnica adventícia e depósito de material fibrinoso. HE, Objetiva 40. **D:** Meningite com infiltrado inflamatório de mononucleares e deposição de material fibrinoso. HE, Objetiva 40.

4.2.4. Histórico Clínico

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos OHV-2-positivos que foram relatados pelos veterinários e proprietários, em ordem decrescente de frequência, foram: incoordenação (100%), rigidez de pescoço (58.8%), movimentos de pedalagem (52.9%), decúbito (52.9%), incapacidade de se levantar (47.1%), apatia (35.3%), opistótono (35.3%), paralisia dos membros posteriores (29.4%), tremores (23.5%) e sialorréia (23.5%) (Tab. 4). Em 2 casos, os animais apresentaram paralisia flácida dos

membros posteriores, protusão de língua e paralisia de cauda.

A evolução do quadro neurológico dos bovinos afetados pelo OHV-2 variou de 1 a 8 dias, sendo que em 52,9% dos casos apresentou-se de forma hiperaguda, entre 1 e 2 dias (Tab. 4). Devido ao curso hiperagudo nesses casos, as primeiras suspeitas dos veterinários foram as clostridioses, incluindo botulismo ou algum tipo de intoxicação. A observação clínica de paralisia flácida dos membros posteriores, protusão de

língua e paralisia de cauda, em dois desses casos, intensificou as suspeitas.

Bovinos de ambos os sexos foram acometidos pelo OHV-2, com 94% dos casos, fêmeas. A idade dos bovinos afetados variou de 12 meses a 8 anos, sendo 70,6% dos casos, entre 2 a 5 anos (Tab. 4).

Na maioria das propriedades acometidas pelo OHV-2 (13/17 - 76,5%), a doença neurológica apresentou-se de forma esporádica, afetando somente um bovino por rebanho, sendo que em 2 propriedades, 4 e 5 bovinos foram afetados. Entretanto, uma forma endêmica da doença foi observada em 2 propriedades, afetando 10 e 30 animais por rebanho (Tab. 4).

Apesar do número pequeno de amostras positivas, as taxas de letalidade observadas foram de 50-100%. Alguns casos de OHV-2 apresentaram caráter sazonal, com 64,7 % ocorrendo na primavera, sendo 11 casos em novembro e um caso em outubro (Tab. 4).

4.2.5. Histórico de contato com ovinos

De acordo com a presença do OHV-2 nestas propriedades, tornou-se necessária a investigação sobre o envolvimento de ovelhas com os bovinos afetados, uma vez que as ovelhas são reservatórios e fontes de transmissão do OHV-2 para os bovinos. Estas informações adicionais foram obtidas diretamente com os proprietários e

veterinários responsáveis de cada propriedade acometida pelo OHV-2.

Em 6 propriedades havia contato de ovelhas com o rebanho de bovinos. Em uma dessas propriedades, um surto de doença neurológica envolvendo 30 animais foi observado e estes animais compartilhavam o pasto com um pequeno rebanho de 20 a 40 ovelhas. Em outra propriedade, esporadicamente, havia contato direto de ovelhas com o rebanho de bovinos. Nessa fazenda 10 animais apresentaram sinais nervosos, sendo que 5, morreram.

Das 11 propriedades onde os bovinos não tinham contato direto com ovelhas, a presença de ovelhas na região foi relatada em 7 propriedades. Entretanto, em 3 propriedades, apesar da falta de contato de ovelhas na fazenda e região, havia trânsito de bovinos entre propriedades, onde animais de outras propriedades compartilhavam o mesmo pasto esporadicamente ou havia compra de bovinos de outra região sem informações antecedentes sobre contato com ovelhas (Tab. 4).

As 17 propriedades onde ocorreram os casos de OHV-2 estão localizadas em 7 das 10 regiões administrativas de Minas Gerais, portanto, estão dispersas por todo o estado. Somente na parte leste de Minas Gerais não houve relato de casos de OHV-2 (Fig. 6).

Tabela 4. Características apresentadas pelos bovinos positivos para o OHV-2.

No. De registro dos bovinos	Número dos bovinos positivos para OHV-2																	
	16	15	1	14	17	2	11	13	9	10	8	12	4	5	3	7	6	
Mês da morte	Fev	Abr	Jul	Jul	Jul	Jul	Out	Nov	Nov	Nov	Nov	Nov	Nov	Nov	Nov	Nov	Nov	
Idade	4 anos	5 anos	8 anos	5 anos	2 anos	2 anos	4 anos	7 anos	4 anos	12 meses	4 anos	4 anos	2 anos	2 anos	6 anos	2 anos	5 anos	
Sexo	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	M	F	F	F	
Tipo de Produção																		
Corte	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	
Leite	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
Curso clínico da doença (dias)	4	4	2	1	4	2	4	8	2	2	1	6	2	1	2	2	1	
Sinais Nervosos																		
Ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Rigidez de Pescoço	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Movimento de Pedalagem	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
Decúbito	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	
Incapacidade de se levantar	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	
Apatia	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
Opistotono	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
Paralisia dos membros posteriores mas alerta	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
Tremores	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
Sialorria	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
PCR																		
OHV-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BHV-5	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	
BHV-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CHV-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AHV-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SHV-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Contato com ovinos na propriedade	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
Criação de ovinos na região	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Transito de animais entre propriedades	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
No. de animais com sinais nervosos no rebanho	4	1	1	1	1	5	1	1	1	30	1	1	2	10	1	1	1	
No. de animais que morreram com sinais nervosos no rebanho	4	1	1	1	1	5	1	1	1	30	1	1	2	5	1	1	1	

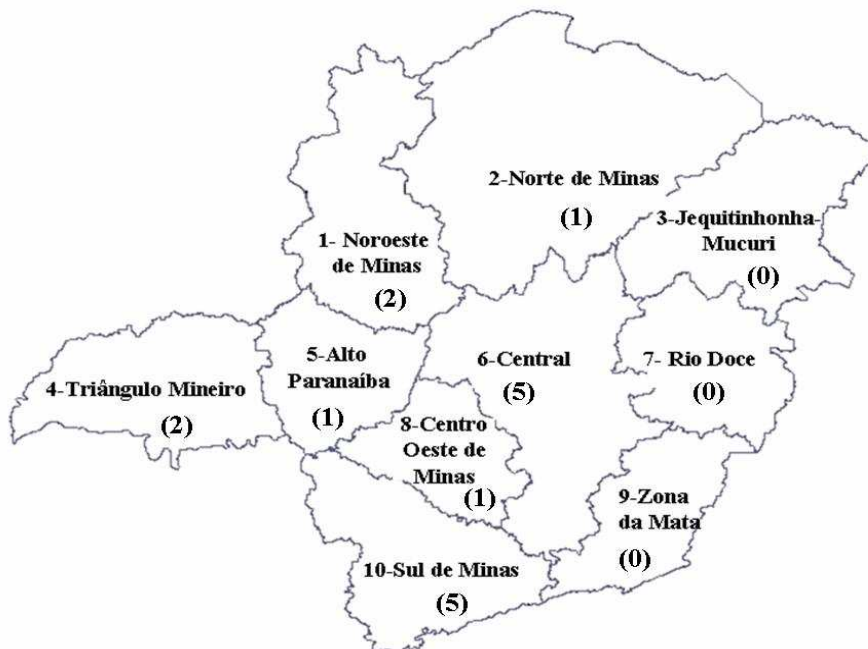


Figura 6. Distribuição geográfica por região dos casos de OHV-2, descritos entre parênteses.

4.2.6. Discussão

Neste trabalho a presença do OHV-2 foi detectada por PCR no DNA extraído de 17 amostras de fragmentos de SNC de bovinos que morreram com sinais neurológicos, sendo que 5 dessas amostras foram seqüenciadas, comprovando a identidade deste vírus. As 17 propriedades onde ocorreram os casos de OHV-2 estão localizadas em 7 das 10 regiões administrativas de Minas Gerais, portanto, mostrando que o vírus está disseminado por todo o estado.

Os relatos de FCM em Minas Gerais são escassos, sendo que o primeiro relato de surto de FCM em bovinos ocorreu no município de Curvelo em abril de 1997. Nessa ocasião, 5 bovinos de um rebanho de 80 animais adoeceram apresentando sinais clínicos de incoordenação motora, tremores musculares, lacrimejamento bilateral, opacidade de córnea, corrimento nasal muco-purulento, hematúria, inapetência e convulsões. A lesão histopatológica predominante foi uma vasculite linfocitária e o rebanho de bovinos compartilhava o pasto com 30 ovinos, estando várias ovelhas em final de gestação ou recém paridas (Ferreira et al., 1997). Entretanto, bovinos apresentando quadro clínico característico de FCM são observados desde 1996, no estado, com pelo menos 1 caso/ano, mas sem uma comprovação anatomohistopatológica (Comunicação pessoal, Prof. Antônio Último de Carvalho e Prof. Elias Jorge Facury Filho da Escola de Veterinária, UFMG).

Em 2006, um surto de FCM em búfalos da raça Murrah foi relatado no município de Esmeraldas, resultando na morte de 5 búfalos de um rebanho de 145 animais que compartilhava o pasto com 50 ovelhas. Nesta ocasião, além do histórico, achados clínicos e anatomohistopatológicos de FCM, o DNA do OHV-2 foi detectado tanto nos búfalos que morreram, quanto nas ovelhas (Costa et al., 2008).

A presença do OHV-2 em ovelhas e cabras no Estado de Minas Gerais também tem sido pesquisada através de ensaios de PCR, em leucócitos do sangue periférico (PBL) (dados não publicados). Em 10 rebanhos já analisados pelo prof. Mauricio Resende no LVC-ICB/UFMG, todas as ovelhas com mais de 1 ano de idade foram positivas para o OHV-2, possivelmente disseminando ativamente o vírus e transmitindo-o para os bovinos (Comunicação pessoal, Prof. Mauricio Resende). Powers et al (2005) relataram que infecções subclínicas em ovelhas

podem alcançar até 99% em regiões geográficas específicas dos Estados Unidos da América, sendo que esta alta prevalência é observada em ovelhas de muitos países.

Os casos de FCM associados ao OHV-2 em bovinos ocorrem preferencialmente, na primavera e verão (Rech et al., 2005). Essa tendência foi também verificada na maioria dos casos de FCM aqui descritos. Acredita-se que este caráter sazonal da FCM em bovinos esteja relacionado com a época de parição das ovelhas, onde há uma maior disseminação viral (Li et al., 1998).

De acordo com os proprietários e veterinários responsáveis, os bovinos infectados com o OHV-2, neste trabalho, não apresentaram sinais clínicos compatíveis com a FCM, como os já relatados em bovinos no estado de Minas Gerais, somente sinais nervosos. Apesar da doença neurológica observada nos bovinos ser compatível com a forma nervosa da FCM, é pouco específica, o que dificulta em uma suspeita clínica inicial de FCM e no diagnóstico diferencial com base somente no exame clínico. Entretanto, distúrbios nervosos são comuns na FCM dos bovinos, sendo que a forma nervosa dessa doença deve ser sempre considerada como uma possibilidade no diagnóstico diferencial das doenças do SNC de bovinos (Rech et al., 2005).

Presume-se que a transmissão da FCM-AO para bovinos ocorra pelo contato com ovinos. Nas ocorrências de FCM relatadas neste estudo, este contato foi observado em apenas 6 propriedades. Vale ressaltar que nas propriedades onde foi observada uma quantidade maior de animais doentes, havia contato dos bovinos com ovelhas. Entretanto, em 7 propriedades, não havia contato direto entre as espécies, mas havia criação de ovelhas na região. Estudos têm demonstrado que não há necessidade de contato direto entre ovelhas e bovinos para que ocorra a infecção de bovinos através dos ovinos. Casos de disseminação do OHV-2 entre as duas espécies têm sido relatados a distâncias maiores que 70 metros (Powers et al., 2005).

Nos casos onde não havia criação de ovinos, tanto na propriedade quanto na região, o trânsito de bovinos foi sempre relatado. Nestes casos, os bovinos eram introduzidos no rebanho sem um histórico do local de origem ou através do consórcio de pastagens. No entanto, não foram observadas utilizações de práticas de manejo como isolamento dos animais e testes adicionais para a introdução de novos animais nos rebanhos analisados. Deste modo, a introdução e a

disseminação de doenças infecciosas no rebanho foram facilitadas. Além disso, a existência de uma cadeia epidemiológica de transmissão do OHV-2 entre bovinos, mantida por animais infectados latentemente, subclínicamente, cronicamente ou que se recuperaram não poderia ser ignorada nestes casos. Já que animais clinicamente susceptíveis à FCM têm se tornado mais resistentes ao OHV-2 (O'Toole et al., 1997; Powers et al., 2005). Vale salientar que bovinos infectados pelo OHV-2 permanecem persistentemente infectados, podendo disseminar o vírus através da ativação da infecção latente (O'Toole et al., 1997; Macedo et al., 2007). Por outro lado, como surtos de FCM em veados já foram relatados no Brasil (Driemeier et al., 2002) e considerando a proximidade desses animais nas propriedades pesquisadas, a possibilidade de infecção dos bovinos através dos veados não pode ser descartada. Uma vez que também são acometidos pela FCM, desenvolvem a doença e poderiam ser possíveis carreadores do OHV-2.

As principais alterações histopatológicas em casos de FCM de bovinos, como a vasculite caracterizada por infiltrado linfocitário na túnica adventícia e espaço perivascular com deposição de material fibrinóide, não foram observados em todos os encéfalos OHV-2 positivos. Quando relatadas, essas alterações foram consideradas discretas. Nesses casos, apesar da vasculite ser discreta e da ausência de uma necrose de epitélios com infiltrado inflamatório da lâmina própria, também comum em casos de FCM em bovinos, um diagnóstico histopatológico de FCM pode ser considerado (Comunicação pessoal, Taismara de Oliveira, veterinária patologista do IMA).

Como ocorrido em alguns casos neste trabalho, às vezes somente uma encefalite é encontrada no SNC, embora as lesões vasculares características de FCM em bovinos, sejam frequentemente observadas no SNC e rins (Rech et al., 2005). Isso acontece porque, na maioria das vezes, para se encontrar as lesões características de FCM é necessário examinar muitos cortes de um mesmo órgão ou até mesmo vários órgãos (Rech et al., 2005). Diante disso, apesar da FCM ser considerada como uma possibilidade no diagnóstico diferencial de doenças do SNC é essencial que fragmentos de diferentes órgãos como pulmões, rins, baço e fígado também sejam coletados (O'Toole et al., 2002).

Vale salientar que a ausência de uma vasculite linfóide no SNC pode, também, estar associada ao fato dos animais estarem nos estágios pré-clínico e/ou clínico-precoce da FCM, onde as lesões patológicas e histológicas da doença são

encontradas primeiramente na bexiga, cecum, cólon, laringe, faringe e pulmões, (O'Toole et al., 2006), sendo que o SNC é um dos últimos sistemas a apresentar lesões.

Em alguns encéfalos OHV-2 positivos, uma degeneração do SNC foi observada com neurônios e células de Purkinje retraídos, necrose neuronal, gliose e neuronofagia, juntamente com lesões vasculares sem cunho inflamatório. Este infarto do tecido nervoso parece ter sido consequência de uma isquemia e anóxia tecidual, o que provavelmente levou também a necrose de neurônios em algumas áreas do cérebro (Spilki et al., 2002). Além disso, por ser a FCM uma doença sistêmica, a presença de lesões graves em importantes órgãos como pulmões, fígado, rins e baço podem levar o animal a apresentar uma sintomatologia nervosa, mesmo sem a presença de lesões de cunho inflamatório no SNC (Schultheiss et al., 1998).

Com relação aos 8 casos de infecção concomitante do OHV-2 com o BHV-5 podemos sugerir que a presença do OHV-2, seja na forma subclínica, clínica, pré-clínica, branda ou latente, tenha auxiliado o BHV-5 na indução de uma meningoencefalite de curso agudo, uma vez que o OHV-2 também é capaz de induzi-la. Além disso, a associação do BHV-5 com outros agentes infecciosos pode reativar infecções latentes pelo BHV-5 em bovinos, exacerbando os sinais clínicos da infecção neurológica (Rissi et al., 2007).

Como os animais susceptíveis clinicamente à FCM têm se tornado mais resistentes ao OHV-2, um aumento no número de bovinos que apresentam a forma crônica, subclínica, branda, que se recuperaram da doença ou que sobreviveram por longos períodos tem sido relatado (O'Toole et al., 1997). Atualmente, a técnica de PCR vem sendo utilizada como método de diagnóstico para investigar a epidemiologia da doença, particularmente, a função da infecção latente ou inaparente na transmissão do OHV-2 entre espécies de ruminantes, tanto nos surtos naturais de FCM como em populações de ruminantes clinicamente saudáveis (Baxter et al., 1993; O'Toole et al., 1997).

No presente trabalho, o teste de PCR específico para o OHV-2 foi essencial para o diagnóstico devido à ausência dos sinais clínicos característicos da doença, comumente relatados em bovinos, e da falta de material suficiente para se fazer uma triagem das lesões histopatológicas compatíveis com a FCM.

De acordo com os resultados obtidos, torna-se necessário a inclusão do OHV-2 no diagnóstico de doenças neurológicas no estado, uma vez que o OHV-2 não está somente presente, mas disseminado por todo o estado.

4.3. Estudo da presença do SHV-1, vírus da doença de Aujeszky, nas amostras de SNC dos bovinos pesquisados

4.3.1. Ensaio de PCR

O DNA do SHV-1 foi detectado em 5 das 6 amostras de SNC dos bovinos provenientes das inoculações em camundongos e no SNC dos camundongos inoculados pelas respectivas amostras. Todas as amostras positivas para o SHV-1 amplificaram um fragmento específico de 263 pb (gG). Antes da morte, todos os camundongos inoculados com amostras de SNC dos bovinos infectados pelo SHV-1 apresentaram incoordenação, fraqueza, pêlos arrepiados e paralisia.

4.3.2. Multiplicação viral em células SK6

Fragments do SNC de 3 bovinos com resultados positivos para o SHV-1, escolhidos aleatoriamente, foram homogeneizados em solução salina 10% (p/v) e inoculados em monocamadas de células SK6 para o isolamento viral, de acordo com protocolo descrito no item 3.4. Em todos os cultivos constatou-se o efeito citopático (ECP) característico dos herpesvírus após aproximadamente a 3ª sub-passagem. A confirmação do isolamento viral foi feita através de ensaios de PCR.

4.3.3. Seqüenciamento

As 2 amostras de SNC positivas que não foram isoladas no cultivo celular, foram seqüenciadas a partir do produto obtido por PCR (amostras 122 e 1097). As seqüências editadas foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e receberam os seguintes números de acesso: DQ866808 (122) e DQ855963 (1097). Para a pesquisa de homologia, essas seqüências de nucleotídeos foram, então, comparadas com seqüências de nucleotídeos de parte do genoma do SHV-1 que codifica para a glicoproteína G (gG) disponíveis no GenBank através do algoritmo BLASTN. De acordo com as similaridades apresentadas, as 2 seqüências foram confirmadas como SHV-1.

4.3.4. Achados histopatológicos no SNC dos bovinos

A lesão macroscópica observada nos encéfalos dos bovinos SHV-1 positivos foi uma congestão acentuada no cérebro. A avaliação histopatológica do encéfalo dos bovinos positivos para o SHV-1 revelou uma hemorragia de meninges e manguitos perivasculares de mononucleares. Os cérebro e cerebelo apresentaram hiperemia de meninges e de neurópilo e manguitos perivasculares de mononucleares, característicos de meningoencefalite não supurada.

4.3.5. Histórico Clínico

Os únicos sinais clínicos observados pelos veterinários responsáveis e proprietários dos bovinos que morreram com a doença de Aujeszky foram incoordenação, tremores, paralisia dos membros posteriores, movimentos de pedalagem, flacidez e insensibilidade de cauda, agitação, sialorréia e decúbito. A evolução do quadro clínico dos bovinos afetados variou de 2 a 5 dias, sendo que em nenhum caso foi observada a presença de prurido local intenso, nem mutilações.

Os casos de Aujeszky ocorreram sem nenhum agrupamento sazonal e apresentaram-se de forma isolada, com o acometimento de um único bovino por propriedade. As propriedades afetadas estão localizadas nas regiões do Alto Paranaíba, Noroeste e Norte de Minas Gerais.

4.3.6. Histórico de contato com suínos

Com a confirmação da presença do vírus da doença de Aujeszky (VDA) em bovinos no estado de Minas Gerais, tornou-se necessária uma investigação sobre o envolvimento de suínos, domésticos ou selvagens, com os bovinos afetados, uma vez que estes animais constituem o reservatório natural do vírus.

Um relatório de investigação epidemiológica para a doença de Aujeszky foi feito juntamente com o IMA para a observação de algumas características ligadas a doença nas propriedades afetadas. Tais informações eram referentes à presença ou não de suínos na região e/ou propriedade, tipo de criação de suínos, presença de problemas reprodutivos nos suínos e a observação de sinais nervosos em outros tipos de animais na propriedade. Um exemplo deste relatório está no Anexo 2. Estas características estão ligadas diretamente ao SHV-1 já que causa abortos em suínos e nascimento de fetos mumificados ou leitões mortos e possui um amplo círculo de hospedeiros que inclui vários

mamíferos como ruminantes, eqüinos, caninos e felinos, nos quais a infecção neurológica é geralmente terminal (Gustafson, 1986).

De acordo com as informações obtidas pelos veterinários e proprietários, havia criação de suínos, do tipo autônoma ou de fundo de quintal, em todas as regiões ao redor dos casos de Aujeszky em bovinos relatados, sendo que somente em uma propriedade havia criação de suínos para consumo próprio. Não foi notado sinal neurológico em nenhum outro tipo de animal nas propriedades pesquisadas, além dos bovinos.

Um inquérito sorológico foi feito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nos municípios onde ocorreram os casos de Aujeszky durante o ano de 2006. Os casos de Aujeszky nos bovinos ocorreram nos municípios de Patos de Minas, Lagoa Formosa, Unaí e Pirapora, sendo que 2 casos ocorreram em Patos de Minas. Levando em consideração cada foco de Aujeszky nos bovinos, foram coletadas amostras de sangue de todos os suínos do tipo autônoma ou de fundo de quintal, dentro de um raio de 5 Km, totalizando 400 amostras. As amostras foram submetidas à prova de soroneutralização, com resultado negativo em todas as amostras coletadas (IMA).

4.3.7. Discussão

Neste trabalho foram detectados 5 casos de Aujeszky em bovinos que morreram com sinais nervosos no estado de Minas Gerais. A doença de Aujeszky (DA) foi descrita no estado, primeiramente em 1922, sendo isolado o vírus do cérebro de um bezerro de aproximadamente 20 dias de idade. Posteriormente, o vírus foi isolado do SNC de bovinos, nos municípios de Varginha, Viçosa, Sacramento e Almenara, durante os anos de 1931, 1940, 1950 e 1961, respectivamente (Da Silva & Gióvine, 1961). Durante o período de 1973 a 1976, casos de Aujeszky em bovinos foram observados constantemente no estado. Após esse período os casos tornaram-se esporádicos (Comunicação pessoal, Prof. Antônio Último de Carvalho e Prof. Paulo Marcos Ferreira, Escola de Veterinária, UFMG). No ano de 1988, o vírus da doença de Aujeszky foi isolado da tonsila de um leitão da raça Piau oriundo de um rebanho da fazenda de Igarapé/MG da Escola de Veterinária da UFMG, onde não foram observados sinais clínicos da doença (Cândido et al., 2000b). Estas observações são relevantes, pois apesar das granjas de suinocultura industrial em Minas Gerais estarem livres da doença, o VDA está

presente no estado, através da detecção em bovinos e suínos da raça Piau (Da Silva & Gióvine, 1961; Cândido et al., 2000). Vale ressaltar que os bovinos são considerados indicadores da presença do VDA, por serem mais sensíveis à infecção do que os suínos, apresentando sinais clínicos mais evidentes. O estado do Rio Grande do Sul é um exemplo, pois 48 anos antes da doença de Aujeszky ter sido notificada em granjas de suínos, a notificação original ocorreu em bovinos (Groff et al., 2005).

Relatos da presença do VDA em suínos da raça Piau, geralmente utilizados em criações de fundo de quintal, sugere uma fonte de infecção para os bovinos. Em Minas Gerais, há várias pequenas propriedades que criam suínos domésticos para o consumo próprio, sem condições sanitárias adequadas e com certa promiscuidade animal. Com isso, a transmissão do SHV-1 aos outros animais pode ser favorecida, através do contato direto com os suínos ou pela alimentação à base de restos de suínos (Gustafson, 1986). Entretanto, a fonte de infecção dos bovinos SHV-1 positivos, no presente trabalho, permanece uma incógnita, uma vez que os resultados da soroneutralização das amostras de sangue coletadas dos suínos, oriundos de uma circunferência de 5 Km dos focos de Aujeszky, foram negativos.

As propriedades afetadas pelo VDA estão localizadas em regiões de Minas Gerais que fazem divisas com os estados da Bahia e Goiás. Vale ressaltar que em 1997, foram registrados casos de Aujeszky em matrizes de suínos de sistema de produção no estado de Goiás (Souza et al., 2002).

As lesões histopatológicas observadas no encéfalo dos bovinos infectados pelo VDA foram inconclusivas. Foi observada uma hemorragia de meninges e discreta meningoencefalite não supurativa espalhada por todo o encéfalo, sem predisposição por localização no encéfalo, como ocorre nos BHV-5. Esses achados são compatíveis com casos de Aujeszky, onde um diagnóstico sugestivo não pode ser feito com base no exame histopatológico (Barros et al., 2007).

Algumas características da doença de Aujeszky são peculiares, auxiliando no diagnóstico, tais como a presença de um prurido intenso localizado em várias partes do corpo do animal infectado e a alta sensibilidade de camundongos (Flatschart & Resende, 2001). Neste trabalho, a presença do prurido intenso não foi observada em nenhum dos casos da DA nos bovinos. Com isso, a suspeita de infecção pelo SHV-1 foi feita

através da morte precoce, em torno de 12-24 horas, de camundongos inoculados via intracerebral com suspensão de 20% de fragmentos do SNC dos bovinos afetados. Apesar de o diagnóstico definitivo ter sido feito pela detecção do SHV-1 através do ensaio de PCR, a sensibilidade dos camundongos foi essencial para o direcionamento do diagnóstico.

Um diagnóstico de campo pode se basear no histórico e nos sinais clínicos. O relato de mortalidade repentina de ruminantes, equinos, cães e/ou felinos, a presença de prurido (peste de coçar) ou paralisia dos membros posteriores e a presença de suínos na região e/ou propriedade são evidências epidemiológicas da ocorrência da DA (Cândido et al., 2000; Sandrin, 2000). Nos casos de Aujeszky relatados no presente trabalho, os sinais clínicos, a evolução rápida do quadro clínico e a presença de suínos na região foram compatíveis com a DA. Entretanto, não foram observadas mortes de outros mamíferos nas propriedades afetadas.

Um diagnóstico definitivo de DA somente pode ser obtido através de exames laboratoriais como isolamento em cultivo celular ou PCR. Os órgãos de escolha para a realização do diagnóstico virológico em bovinos são o cérebro, cerebelo e medula espinhal (Sandrin, 2000). No entanto, o diagnóstico sorológico como ELISA e soroneutralização assumem importância em programas de controle de focos de Aujeszky somente em suínos, já que os outros animais, como os bovinos são considerados hospedeiros terminais e morrem antes mesmo da soroconversão (Callan & Van Metre, 2004).

4.4. Estudo da presença do BHV-4 nas amostras de SNC dos bovinos pesquisados

4.4.1. Ensaios de PCR

Dentre as 413 amostras de SNC de bovinos que morreram com sinais nervosos, 14 (3,4%) foram positivas para o BHV-4. Não houve detecção de outros gamaherpesvírus como o OHV-2, AHV-1 e CHV-2. Entretanto, em 2 das 14 amostras BHV-4 positivas, foi observada, primeiramente, a detecção do BHV-5 através dos ensaios de PCR descritos no tópico 4.1. Todas as amostras positivas para o BHV-4 amplificaram um fragmento em torno de 260 pb (timidina kinase).

4.4.2. Seqüenciamento

Das 14 amostras positivas, 4 foram seqüenciadas a partir do produto obtido por PCR purificado (MGArom, MGA696, MGA514, MGA1075). As seqüências editadas foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e receberam os seguintes números de acesso: EU244697 (MGArom), EU244698 (MGA696), EU244699 (MGA514), EU244700 (MGA1075). Essas seqüências de nucleotídeos foram, então, comparadas com seqüências de nucleotídeos do genoma do BHV-4 que codifica parte do gene da timidina kinase disponíveis no GenBank para avaliação da identidade, através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* – BLASTN.

Através da comparação, um maior grau de identidade à nível de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foi observado entre as seqüências brasileiras de BHV-4 com as seguintes seqüências homólogas disponíveis no GenBank: (S49773), (AF318573), B11-41 (AB035515), Movar33/63 (AB035516) e 86-068 (AB035517). Para esta região genômica, o grau de identidade em nível de nucleotídeos e de aminoácidos variou entre 91 a 98% e 95 a 99%, respectivamente. Adicionalmente, a amostra brasileira MGA696 apresentou uma deleção de uma trinca de nucleotídeos nas posições 529 a 531 (baseado no GenBank PubMed Protein Query número de acesso: AAB24378), causando a perda do aminoácido lisina (K). Esta característica não foi observada em nenhuma outra seqüência brasileira.

4.4.3. Achados histopatológicos no SNC

A avaliação histopatológica do encéfalo de 5 bovinos positivos para o BHV-4 revelou uma meningoencefalite não-supurativa com infiltrado inflamatório perivascular de células mononucleares, neuronofagia, redução dos neurônios com escurecimento do citoplasma no óxex e colículo, gliose e hemorragia meningeal (Fig. 7 A). Em 2 destes casos de BHV-4, uma co-infecção com o BHV-5 foi detectada.

No encéfalo de outros 5 bovinos BHV-4 positivos, o exame histopatológico revelou uma meningoencefalite não supurada afetando o cérebro e o cerebelo com lesões notadamente vasculares como hemorragias, trombos e vasculite linfocítica (Fig. 7 B).

Em 4 bovinos, o exame histopatológico do encéfalo não foi feito devido a má conservação do material, somente os ensaios de PCR para detecção dos herpesvírus no SNC.

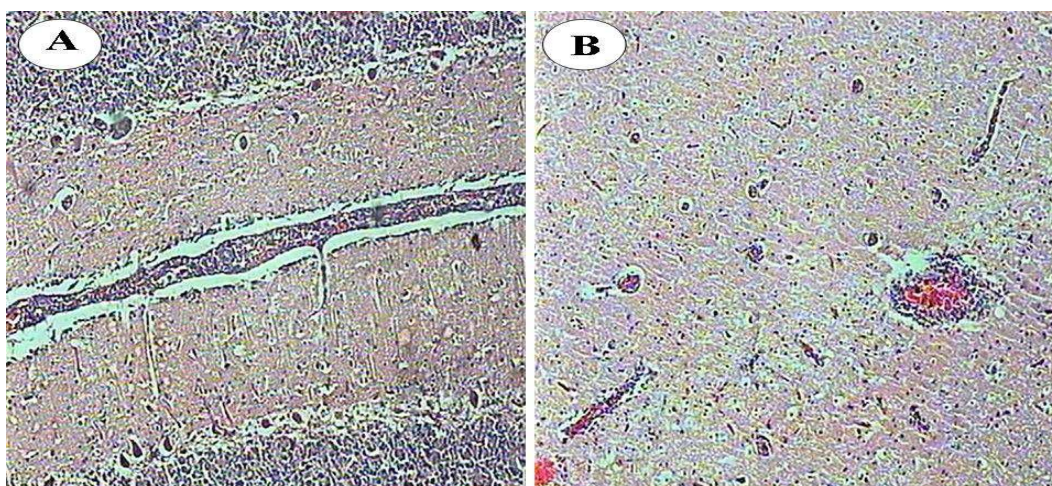


Figura 7. Exame histopatológico do encéfalo de um bovino que morreu apresentando sinais nervosos com um diagnóstico positivo para o BHV-4. **A:** Meningoencefalite não supurada afetando cerebelo e cérebro com infiltrados múltiplos de mononucleares, HE, objetiva 10. **B:** Encefalite não supurada afetando tronco encefálico, com gliose e manguitos perivasculares múltiplos de mononucleares, além de vasculite linfocítica, HE, objetiva 10.

4.4.4. Histórico Clínico

Os sinais nervosos relatados pelos veterinários e proprietários, em ordem decrescente de frequência, foram incoordenação (85,7%), decúbito (57,1%), incapacidade de se levantar (50,0%), agitação (42,9%), opistótono (35,7%), movimentos de pedalagem (28,6%), nistagmo (28,6%), sialorréia (28,6%) e dificuldade de se levantar (28,6%) (Tab. 5).

A evolução do quadro neurológico dos bovinos afetados variou de 1 a 15 dias, sendo que em 64,3% dos casos apresentou-se entre 1 a 4 dias. Bovinos de ambos os sexos foram acometidos, com 85,7% dos casos, em fêmeas. A idade dos bovinos afetados variou de 3 meses a 7 anos, sendo 50% dos casos, com 2 anos (Tab. 5).

Tabela 5. Características apresentadas pelos bovinos positivos para BHV-4.

No. de registro dos bovinos	Número dos bovinos positivos para BHV-4													
	10	73	120	122	202	224	514	516	671	743	696	988	1168	1252
Mês da morte	Jan	Jan	Jan	Fev	Fev	Mar	Mai	Mai	Jun	Jul	Set	Set	Out	Nov
Idade	2 anos	2 anos	1 ano	2 anos	5 anos	2 anos	2 anos	3 anos	5 anos	2 anos	3 meses	2 anos	4 anos	7 anos
Sexo	F	F	F	F	F	F	M	F	F	M	M	F	F	F
Tipo de Produção														
Corte	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Leite	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Curso clínico da doença (dias)	15	1	1	4	3	6	3	1	3	2	5	5	4	8
Sinais Nervosos														
Incoordenação	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Decúbito	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Incapacidade de se levantar	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Alerta	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Opiotono	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Movimento de Pedalagem	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Nistagmo	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Sialorréia	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Dificuldade de se levantar	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
PCR														
BHV-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BHV-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
No. de animais com sinais nervosos no rebanho	1	1	4	1	2	1	1	6	1	11	30	6	1-	1
No. de animais que morreram com sinais nervosos no rebanho	1	1	4	1	2	1	1	6	1	11	30	6	1	1

Na maioria das propriedades (10/14 – 71,4%), a doença neurológica apresentou-se de forma esporádica, afetando 1 a 4 bovinos por rebanho, sendo que em 4 propriedades (28,6%), 6 a 30 bovinos foram afetados. Os casos de BHV-4 não apresentaram caráter sazonal (Tab. 5).

Na propriedade onde ocorreu morte de 30 bezerros com sinais nervosos, foram coletadas amostras de sangue em tubos de EDTA de 37 vacas, sendo 30 destas provenientes das respectivas mães e o restante coletado de vacas selecionadas aleatoriamente. Em 28 das 30 vacas que pariram os bezerros que morreram com sinais nervosos, o DNA do BHV-4 foi detectado nos leucócitos do sangue periférico (PBL). Nas 7 vacas restantes, o BHV-4 foi detectado em 4 vacas que apresentavam mastite, não sendo detectado nas outras vacas, aparentemente sadias.

Em 2 propriedades, além dos sinais nervosos, os animais apresentaram sinais respiratórios como tosse, respiração ofegante e dispnéia.

De acordo com informações dos proprietários e veterinários responsáveis, à necropsia, os pulmões dos bovinos estavam 60% congestionados. Nestas 2 propriedades, um exame sorológico para o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) evidenciou animais soropositivos.

De acordo com informações relatadas pelos veterinários responsáveis e proprietários, em todas as propriedades afetadas pelo BHV-4, casos de mastite e problemas reprodutivos eram observados com frequência.

As 14 propriedades onde ocorreram os casos de BHV-4 estão localizadas em 7 das 10 regiões administrativas de Minas Gerais, portanto, estão dispersas por todo o estado. A região com maior número de casos foi a Central com 5 casos. Somente nas regiões do Rio Doce, Jequitinhonha e Norte de Minas não ocorreram casos de BHV-4. (Fig. 8).

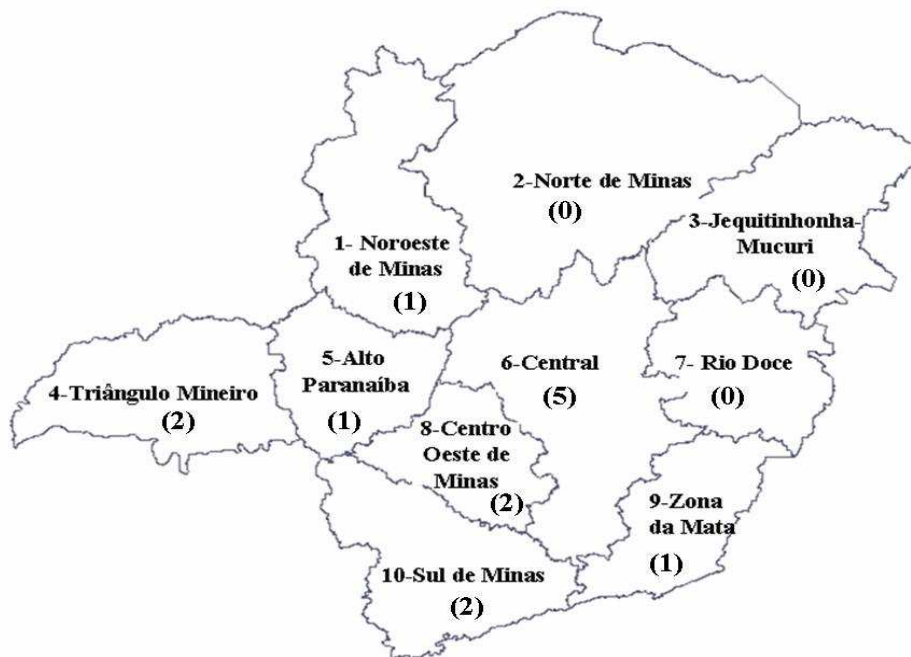


Figura 8. Distribuição geográfica por região dos casos de BHV-4, descritos entre parêntesis.

4.4.5. Discussão

Todas as amostras de BHV-4 detectadas neste estudo foram originárias de SNC de bovinos que morreram após apresentarem sinais neurológicos. Nos encéfalos analisados histopatologicamente, foi observada uma encefalite não supurativa. Casos de distúrbios neurológicos e encefalite em bovinos infectados com o BHV-4, apesar de pouco freqüentes, tem sido relatados (Yamamoto et al., 2000; Fridgut & Stram, 2006). Entretanto, a função do BHV-4 no sistema nervoso ainda é obscura. Ao contrário dos outros herpesvírus, não foi provado que o BHV-4 seja agente causador de alguma doença definida (Fridgut & Stram, 2006), especialmente de desordens neurológicas.

A maioria dos Alfa herpesvírus evita a eliminação pelo sistema imune do hospedeiro através da latência dentro de células do sistema nervoso como os gânglios, durante os intervalos entre episódios da doença (Rissi et al., 2007). Por outro lado, os Beta e Gamaherpesvírus evitam a eliminação através da latência nos linfócitos (Goyal et al., 1992). No presente trabalho, somente em 1 propriedade foram coletadas amostras de sangue em tubos de EDTA para a detecção do BHV-4 em leucócitos (PBL), além da coleta dos encéfalos dos bovinos. Neste caso, o BHV-4 foi detectado em ambas as espécimes,

demonstrando que o vírus estava associado com o SNC e com os leucócitos. Nos outros casos somente a associação com o SNC foi confirmada. De acordo com Yamamoto et al. (2000), quando o DNA do BHV-4 é encontrado no SNC e em linfócitos, sugere-se que o BHV-4 faça latência em ambos os tecidos.

Como o BHV-4 tem sido isolado de uma ampla variedade de condições clínicas em bovinos, as propriedades biológicas, incluindo tropismo celular e sítios de latência podem ser diferentes para cada amostra de BHV-4 (Asano et al., 2003). No caso da amostra B11-41, isolada da medula espinhal de uma vaca com incoordenação motora, o BHV-4 não foi detectado nos pulmões, coração, baço, fígado ou rins. No entanto, o isolado estava associado somente com o sistema nervoso e não com os leucócitos do sangue (Yamamoto et al., 2000). Em outros casos, o BHV-4 foi detectado frequentemente em linfonodos, linfócitos e tecidos do sistema nervoso como cérebro, medula espinhal, gânglio trigêmio e medula oblonga de animais infectados subclínicamente. Estes dados sugerem que infecções subclínicas persistentes no sistema nervoso seja uma propriedade biológica comum dos BHV-4 (Izumi et al., 2006).

Estudos indicam que o BHV-4 está presente na população bovina, em taxas que variam de acordo com a região e que pode ser ativado

quando os animais são expostos a algum estresse, como transporte a longas distâncias, parto, súbitas mudanças de temperatura atmosférica e tratamentos com dexametasona (Izumi et al., 2006). No caso de amostras onde o BHV-4 faz latência no sistema nervoso, a ativação do vírus através da imunossupressão induzida por estresse, talvez, resulte em uma replicação no sítio de latência podendo levar a uma doença neurológica. Vale ressaltar que a desordem neurológica em bovinos infectados pelo BHV-4 pode não ter relação com a sua existência no sistema nervoso (Yamamoto et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que cultivos de células endoteliais são 100 a 1.000 vezes mais sensíveis ao BHV-4 do que as células de linhagem contínua MDBK e que o BHV-4 é capaz de se replicar e iniciar lesões histopatológicas em células do sistema vascular de coelhos infectados experimentalmente (Goyal et al., 1992; Egyed & Baska, 2003). Por seu tropismo por células endoteliais e pelo fato de causar lesões vasculares em mamíferos, uma outra hipótese para as causas de encefalite em alguns bovinos infectados pelo BHV-4, seria o vírus se replicar em células endoteliais do sistema nervoso, provocando uma reação inflamatória através dos danos vasculares. Isso explicaria o fato de alguns bovinos infectados pelo BHV-4, neste trabalho, apresentarem um quadro de encefalite com lesões notadamente vasculares, como hemorragias, trombos e vasculite linfocítica. Pelo fato dos principais alvos de replicação do BHV-4 serem os órgãos linfóides, os tratos respiratório, urogenital e digestivo e por ter um endoteliotropismo acentuado, o BHV-4 tem sido isolado de bovinos com sinais histopatológicos semelhantes aos casos de FCM (Goyal et al., 1992; Asano et al., 2003).

Em torno de 75% dos casos de BHV-4 em que havia alguma manifestação clínica de doença, os animais estavam co-infectados com bactérias, fungos ou outros vírus (Goyal et al., 1992). Esses achados juntamente com o tropismo multisistêmico do BHV-4, principalmente por órgãos linfóides, sugerem que uma relação entre o BHV-4 e co-infecções seja necessária para que ocorra algum sinal clínico (Goyal et al., 1992; Fridgut & Stram, 2006). Neste trabalho, foram encontrados 2 casos de co-infecção com o BHV-5 e em 2 propriedades, os bovinos eram soropositivos para o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV). Vale ressaltar que o BHV-5 é um agente causador de encefalites em bovinos. Nos casos de co-infecção com o BRSV, os bezerros apresentaram não somente os sinais neurológicos, mas sinais respiratórios semelhantes aos ocorridos em infecção pelo

BRSV. Em nenhum dos casos de BHV-4, foram feitos diagnósticos adicionais para bactérias ou fungos. O estresse provocado por uma infecção concomitante, possivelmente resulte na exacerbação da infecção pelo BHV-4. Além disso, sugere-se que a infecção pelo BHV-4 tenha uma função imunossupressora (Goyal et al., 1992).

O BHV-4 está disseminado mundialmente em populações de bovinos, principalmente na América do Norte, Japão, Hungria, Tailândia, Israel e Europa (Egyed & Baska, 2003; Izumi et al., 2006; Fridgut & Stram, 2006). Os casos de BHV-4, neste trabalho, foram relatados em 7 das 10 regiões administrativas de Minas Gerais e portanto, estão dispersas por todo o estado. Em Minas Gerais, a maior parte das propriedades possui problemas de mastite, desordens reprodutivas e abortos, incluindo as propriedades onde o BHV-4 foi detectado. Pelo fato dessas doenças terem o envolvimento de vários agentes causadores, um diagnóstico é bem difícil de ser estabelecido. Como o BHV-4 está frequentemente associado a essas doenças, podemos incluí-lo como um possível fator agravante, já que relatos indicam que surtos de doenças em que o BHV-4 esteja envolvido resultem de processos multifatoriais (Fridgut & Stram, 2006). Todavia, uma pesquisa sorológica na população bovina seria muito importante para a verificação da prevalência do BHV-4 em Minas Gerais. Entretanto, o BHV-4 permanece como um achado esporádico e não implica que seja a causa de doenças neurológicas ou de outras doenças como surtos de abortos e mastites (Fridgut & Stram, 2006).

5. CONCLUSÕES

De 413 amostras de SNC de bovinos que morreram com sinais nervosos, nas quais o vírus rábico não foi detectado por imunofluorescência indireta e inoculação em camundongos, 214 (51,8%) foram positivos para os herpesvírus pesquisados no estado de Minas Gerais. Destas, 188 (87,9%) foram positivas para o BHV-5, 17 (7,9%) para o OHV-2, 14 (6,5%) para o BHV-4, 5 (2,3%) para o SHV-1 e somente 1 para o BHV-1. Uma co-infecção do BHV-5 com o OHV-2 e BHV-4 foi observada em 8 e 2 amostras, respectivamente.

Conclui-se que os herpesvírus estão presentes e são sub-diagnosticados no estado de Minas Gerais. Devido à importância social e econômica da criação de bovinos no Brasil, é essencial a destinação de recursos físicos e financeiros para a especialização de profissionais e capacitação de laboratórios para o diagnóstico neurológico

destas doenças, garantindo, desta maneira, a prosperidade da bovinocultura brasileira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAGID, O.Y.; MINOCHA, H.C.; COLLINS, J.K.; et al. Fine mapping of bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*, v.206, p. 242-253, 1995.

ACKERMANN, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p. 211-22, 2006.

ACKERMANN, M.; BELÁK, S.; BITSCH, V.; et al. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Veterinary Microbiology*, v. 23, p. 361-363, 1990.

ALICE, J.F. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. *Revista Brasileira do Biologia*, v. 38, p. 919-920, 1978.

ANDERSON, I.E.; BUXTON, D.; CAMPBELL, I.; et al. Immunohistochemical study of experimental malignant catarrhal fever in rabbits. *Journal of Comparative Pathology*, v. 136, p. 156-166, 2007.

ANUNCIACÃO, A.V.M.; LEITE, R.C.; MOEIRA, E.C.; et al. Presença de anticorpos para o herpesvirus bovino 1 (HVB 1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 41, p. 433-441, 1989.

AQUINO NETO, H.M. *Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5: Relato de caso*. 2005. 30f. Dissertação (Monografia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ASANO, A.; INOSHIMA, Y.; MURAKAMI, K.; et al. Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain B11-41, in bovine nervous tissues. *Virology*, v. 65, p. 87-93, 2003.

BABIUK, L.A.; VAN DEN HURK, S.D.L.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*, v. 53, p. 31-42, 1996.

BARROS, C.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; et al. "Coleção Vallée - Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil, 2007.

BAXTER, S.I.; POW, I.; BRIDGEN, A.; et al. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Archives of Virology*, v. 132, p. 145-159, 1993.

BERAN, G.W. Understanding the transmission of PRV. *Veterinary Medicine*, v. 88, p. 70-79, 1993.

BONA, C.; DEWALS, B.; WIGGERS, L.; et al. Short communication: Pasteurization of milk abolishes bovine herpesvirus 4 infectivity. *American Dairy Science Association*, v. 88, p. 3079-3083, 2005.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRENNER, J.; PERL, S.; LAHAV, D.; et al. An unusual outbreak of malignant catarrhal fever in a beef herd in Israel. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 49, p. 304-307, 2002.

BROWN, F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canadá 1987. *Intervirology*, v. 30, p. 181-186, 1989.

CALLAN, R.J. & VAN METRE, D.C. Viral diseases of the ruminant nervous system. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 20, p. 327-362, 2004.

CÂNDIDO, A.L.; BONTEMPO, E.D.; RESENDE, M. Polymerase chain reaction amplification of genomic fragments of bovine herpesvirus 1. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 225-226, 2000a.

CÂNDIDO, A.L.; MARTINS, A.S.; RESENDE, M.; et al. Detection of different Brazilian strains of the BHV-1 by polymerase chain reaction. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 241-244, 1999a.

- CÂNDIDO, A.L.; RESENDE, M.; BARROS, P.P.; et al. Development of a DNA probe for detection of Aujeszky's disease virus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 293-299, 1999b.
- CÂNDIDO, A.L.; RESENDE, M.; OLIVEIRA, M.E.; et al. Partial characterization of a Brazilian strain of Aujeszky's disease virus recovered from a pig with subclinical infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 295-301, 2000b.
- CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Journal of Veterinary Medicine Series B*, v. 30, p. 161-168, 1983.
- CARVALHO, R.; RESENDE, M.; FRANCO, G. Teste imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos contra o vírus da doença de Aujeszky em soros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, p. 101-111, 1994.
- CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; OZKUL, A.; et al., Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *Journal of Virology*, v. 74, p. 2094-2106, 2000.
- CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 5 e meningoencefalite herpética bovina. *Ciências Agrárias*, v. 23, p. 131-141, 2002.
- COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, v. 32, p. 293-298, 2002.
- COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LEITE, R.C.; et al. Utilização de parte da região codificadora da glicoproteína B na diferenciação do herpesvírus bovino 1.1, herpesvírus bovino 1.2 e herpesvírus bovino 5. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, p. 143-149, 2005.
- COSTA, E.A.; BASTIANETTO, E.; VASCONCELOS, A.C.; et al. Na outbreak of malignant catarrhal fever in Murrah buffaloes in Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2008 (Artigo Aceito).
- COSTA, E.A. & RESENDE, M. Encefalites herpéticas em bovinos: Um problema emergente. *Revista Veterinária e Zootecnia em Minas*, artigo técnico 3, p. 35-37, 2007.
- CUNHA, C.W.; TRAU, D.L.; TAUS, D.L. et al. Detection of ovine herpesvirus 2 major capsid gene transcripts as na indicator of vírus replication in shedding sheep and clinically affected animals. *Virus Research*, 2007 (in press).
- DA SILVA, R.A. & GIÓVINE, N. Novos focos da doença de Aujeszky no estado de Minas Gerais. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*, v. 4, p. 99-104, 1961.
- DAVISON, A. J. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 86, p. 69-88, 2002.
- DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; et al. Genome of bovine herpesvirus 5. *Journal of Virology*, v. 77, p. 10339-10347, 2003.
- DEWALS, B.; THIRION, M.; MARKINE-GORIAYNOFF, N.; et al. Evolution of bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between Africa buffalo and cattle. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 1509-1519, 2006.
- DONOFRIO, G.; CAVIRANI, S.; VAN SANTEN, V.; et al. Potential secondary pathogenic role for bovine herpesvirus 4. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 3421-3426, 2005.
- DRIEMEIER, D.; BRITO, M.F.; TRAVERSO, S.D.; et al. Outbreak of malignant catarrhal fever in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in Brazil. *Veterinary Record*, v. 151, p. 271-272, 2002.
- DULBECCO, R & VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *Journal of Experimental Medicine*, v. 99, p. 167-182, 1954.

- EGYED, L. & BASKA, F. Histological lesions in vascular tissues of bovine herpes virus type 4-infected rabbits. *Veterinary Microbiology*, V. 91, P. 1-10, 2003.
- EGYED, L.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BARTHA, A.; BELAK, S. Studies of *in vivo* distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 1091-1095, 1996.
- ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, p. 123-131, 2004.
- ENGELS, M. & ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p. 3-15, 1996.
- ENQUIST, L.W.; DUBIN, J.; WHEALY, M.E.; et al. Complementation analysis of pseudorabies virus gE and gI mutants in retinal ganglion cell neurotropism. *Journal of Virology*, v. 68, p. 4279-5275, 1994.
- ENQUIST, L.W.; HUSAK, P.J.; BANFIELD, B.W.; et al. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Advances in Virus Researches*, v. 51, p. 237-247, 1998.
- EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p. 186-194, 1998.
- FERREIRA, P.M.; GUEDES, R.M.C.; DE CARVALHO, A.U.; et al. Febre Catarral Maligna: Relato de um surto no estado de Minas Gerais Anais XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 20 a 24 de outubro, Gramado, Rio Grande do Sul, 1997. PAT 033.
- FITZPATRICK, D.R.; ZAMB, T.J.; PARKER, M.D.; et al. Expression of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1215-1219, 1988.
- FLATSCHART, R.B. & RESENDE, M. Acute and latent infection in mice with a virulent strain of Aujeszky's disease virus. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 308-311, 2001.
- FRIDGUT, O. & STRAM, Y. Bovine herpesvirus 4 in Israeli dairy cattle: isolation, PCR and serology. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 61, p. 56-59, 2006.
- GARMATZ, S.L.; IRIGOYEN, L.F.; RECH, R.R.; et al. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: Transmissão experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, p. 93-106, 2004.
- GOEHRING, L.S.; VAN MAANEN, C.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M. Neurological syndromes among horses in the Netherlands. A 5 years retrospective survey (1999-2004). *Veterinary Quarterly*, v. 27, p. 11-20, 2005.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, p. 495-504, 2002.
- GOYAL, S.M. & NAEEM, K. Bovid herpesvirus-4: a review. *Veterinary Bulletin*, v. 62, p. 181-201, 1992.
- GROFF, F.H.; MERLO, M.A.; STOLL, P.A.; et al. Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p. 25-30, 2005.
- GUSTAFSON, D.P. Pseudorabies. In: *Disease of swine*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1986. cap. 14, p. 274-289.
- HERRMANN, S.C.; HEPPNER, B. LUDWIG, H. Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, v.27, p. 378-401, 1984.
- HOSSAIN, A.; HANG, L.M.; JONES, C. Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology*, v. 69, p. 5345-5352, 1995.
- IZUMI, Y.; TSUDUKU, S.; MURAKAMI, K.; et al. Characterization of bovine herpesvirus type

- 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. *Virology*, v. 68, p. 189-193, 2006.
- KATZ, J.; SEAL, B.; RIPATH, J. Molecular diagnosis of alcelaphine herpesvirus (malignant catarrhal fever) infections by nested amplification of viral DNA in bovine blood buffy coat specimens. *Journal of Diagnostic Investigation*, v. 3, p. 193-198, 1991.
- KEIL, G.M.; ENGELHARDT, T.; KARGER, A.; et al. Bovine herpesvirus 1 Us open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. *Journal of Virology*, v. 70, p. 3032-3038, 1996.
- KHADR, A.; TIKOO, S.K.; BABIUK, L.A.; et al. Sequence and expression of a bovine herpesvirus-1 gene homologous to the glycoprotein K-encoding gene of herpes simplex virus-1. *Gene*, v. 168, p. 190-193, 1996.
- KHATTAR, S.K.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HARKE, S.; ATTAH-POKU, S.; et al. Identification and characterization of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing and transport of BHV-1 glycoprotein gH. *Virology*, v. 219, p. 66-76, 1996.
- KRAMPS, J.A.; PERRIN, B.; EDWARDS, S.; et al. A european inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Veterinary Microbiology*, v. 53, p. 153-161, 1996.
- LEHMANN, E.L., DABREVA, H.J.M. Nonparametrics statistical methods based on ranks; Mc Graw Hill, 1975.
- LI, H.; KELLER, J.; KNOWLES, D.P.; et al. Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 227-232, 2001.
- LI, H.; KELLER, J.; KNOWLES, D.P.; et al. Transmission of caprine herpesvirus 2 in domestic goats. *Veterinary Microbiology*, v. 107, p. 23-29, 2005.
- LI, H.; O'TOOLE, D.; OKJIN KIM, J.; et al., Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, p. 171-175, 2005.
- LI, H.; SNOWDER, G.; O'TOOLE, D.; et al. Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 223-226, 1998.
- LI, H.; SNOWDER, G.; O'TOOLE, D.; et al. Transmission of ovine herpesvirus 2 among adult sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p. 27-35, 2000.
- LI, H.; WUNSCHMANN, A.; KELLER, J.; et al. Caprine herpesvirus-2-associated malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, p.46-49, 2003.
- LIANG, X.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTLE VAN DEN HURK, S.; et al. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *Journal of Virology*, v. 65, p. 1124-1132, 1991.
- LOVATO, L.T. BHV-1 e BHV-5, isolamentos e sorologia no Rio Grande do Sul. *Anais do simpósio internacional ...*. Santa Maria, RS, p. 97-101, 1998.
- MACÊDO, J.T.S.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D.; et al. Febre catarral maligna em bovinos na Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, p. 277-281, 2007.
- MARQUES, L.C.; ALESSI, A.C.; BECHARA, G.H.; et al. Surto de febre catarral maligna em bovinos no estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 38, p. 719-729.
- MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*, v. 30, p. 347-350, 2000.
- MEYER, G., LEMAIRE, M., LYAKU, J.; et al. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Veterinary Microbiology*, v.66, p. 89-99, 1999.
- MIKAWA, S.; YOSHIKA, W.A.G.; AOKI, H.; et al. Dynamic aspects in the expression of the goat

- insulin-like growth factor-1 (IGF-1) gene: diversity in transcription and post-transcription. *Biosci Biotechnol Biochem* v. 59, p. 87-92, 1995.
- MONGE, A.; ELVIRA, L.; GONZALEZ, J.V.; et al. Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a spanish dairy herd. *Veterinary Science*, v. 80, p. 120-125, 2006.
- MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology*, v. 75, p. 145-153, 2000.
- MORÉS, N. & ZANELLA, J.C. Programa de erradicação da doença de Aujeszky no Estado de Santa Catarina. *Anais XI Congresso de Veterinária Especial de Suínos, 30 de setembro a 3 de outubro*, Goiânia, Goiás, 2003. p. 126-131.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.; HORZINEK, M.C.; et al. *Veterinary Virology*. 3.ed. New York: Academic Press, 1999. p. 312-314.
- NADIN-DAVIS, S.A.; LUTZE-WALLACE, C.; ZHONG, X. Bovine herpesvirus 1 isolates contain variable copy numbers of GC-rich tandem repeats in the gI non-coding regions of their genomes. *Virus Gene*, v. 13, p. 263-268, 1996.
- OAKS, J. L.; PRITCHARD, S.; TAUS, et al. Ovine herpesvirus 2 mRNA expression in cattle and bison with malignant catarrhal fever. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 49th ANNUAL CONFERENCE Minneapolis Hilton Minneapolis, Minnesota: October 12 to 18, 2006.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Malignant Catarrhal fever. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*, 2000. 888p.
- OLIVEIRA, M.E.; RESENDE, M., BARROS, P.P. Studies of biological and genomic relationships between two Brazilian isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Virus Review and Research*, v. 8, p. 16-28, 2003.
- O'TOOLE, D.; GAILBREATH, K.; OAKS, J.; et al. Pre-clinical and early clinical lesions of malignant catarrhal fever in bison following experimental inoculation with ovine nasal mucus containing ovine herpesvirus-2 (OvHV-2). *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* (Abstract), 2006.
- O'TOOLE, D.; LI, H.; MILLER, D; et al. Chronic and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. *Veterinary Record*, v. 140, p. 519-524, 1997.
- O'TOOLE, D.; LI, H.; SOURK, C.; et al. Malignant catarrhal fever in a bison (*Bison bison*) feedlot, 1993-2000. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, p. 183-193, 2002.
- PLOWRIGHT, W. Malignant catarrhal fever virus. *Virus Infections of Ruminants*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 123-150.
- POWERS, J.G.; VANMETRE, D.C.; COLLINS, J.K.; et al. Evaluation of ovine herpesvirus type 2 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 227, p. 606-611, 2005.
- RECH, R.R.; SCHILD, A.L.; DRIEMEIER, D.; et al. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p. 97-105, 2005.
- REED, L.D. & MUNCH, H.A. Simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal Hygiene*, v. 27, p. 493-497, 1938.
- RIET-CORREA F., MOOJEN V., ROEHE P.M., et al. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, v. 26, p. 323-332, 1996.
- RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, p. 123-132, 2006.
- RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F. et al. Meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, p. 251-260, 2007.
- ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LOBATO, R.C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no estado de Minas

- Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v, 53, p. 645-647, 2001.
- ROCK, D. L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Virology*, v. 5, p. 233-240, 1994.
- ROEHE, P.M. et al. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. *Anais do simpósio internacional ...*. Santa Maria, RS, 1998. p. 89-96.
- ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Veterinary Record*. V. 147, p. 586-588, 2000.
- ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; et al. The family herpesviridae: an update. *Virology Division News. Archives of Virology*, v. 123, p. 425-449, 1992.
- RÓS, C. & BELÁK, S. Studies of the genetic relationship between bovine, caprine, corvine, and reangiferine alphaherpesvirus and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.1247-1253, 1999.
- RÓS, C. & BELÁK, S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v. 24, p. 99-105, 2002.
- ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 21, p. 173-174, 1993.
- SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, p. 75-82, 1998).
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 545.
- SAMPAIO, F.A.; SAMPAIO, A.A.; DACORSO FILHO, P. 1972. Surto de febre catarral maligna em campos, RJ. 8º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Brasília, p. 275. (Resumo).
- SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, p. 113-118, 2000.
- SANDRIN, A. *Estudo educativo epidemiológico da doença de Aujeszky em Santa Catarina no período de 1983 A 1999*. 2000. Dissertação (Especialização) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Cav. Universidade do Estado de Santa Catarina Udesc Lages, SC.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academic of Science of USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1997.
- SANTOS, M.N., BARROS, S.S.; BARROS, C.S.L. Intoxicação em bovinos pelo cogumelo *Ramaria flavo-brunnescens*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 10, p. 105-109, 1975.
- SCHERBA, G.; JIN, L.; SCHNITZLEIN, W.M.; VODKIN, M.H. Differential polymerase chain reaction for detection of wild-type and a vaccine strain of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Journal of Virological Methods*, v. 38, p. 131-144, 1992.
- SCHMITT, B.J.; OSORIO, F.A.; STROUP, W.W.; et al. A comparison of differential diagnostic tests to detect antibodies to pseudorabies glycoproteins gX, gI and gIII in naturally infected feral pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 3, p. 344-345, 1991.
- SCHMIDT, N.J. Cell culture techniques for diagnostic virology. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 5.ed. Washington: American Public Health Association, 1979. 74p.
- SCHULTHEISS, P.C.; COLLINS, J.K.; AUSTGEN, L.E.; et al. Malignant catarrhal fever in bison, acute and chronic cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 10, p. 255-262, 1998.
- SELMAN, I. E. The epidemiology of malignant catarrhal fever. *Veterinary Annual*, v. 27, p. 98-102, 1987.
- SILVA, A.D.; SORTICA, V.A.; BRAGA, A.C. et al. Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no Estado do Rio Grande do Sul em 2003. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p. 21-25, 2005.

- SILVA, M.S. Molecular and antigenic characterization of brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Reviews & Research. XVIII National Meeting of Virology, 14 a 17 de outubro*, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, 2007. p. 89, AV25.
- SMITH, B.P. Malignant catarrhal fever. *Large Animal Internal Medicine*. St. Louis: Mosby, 2002. p. 714-716.
- SOUZA, C.M.; SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da doença de Aujeszky em matrizes de sistemas de produção que abastecem o mercado consumidor de Goiânia. *Ciência Animal Brasileira* v. 3, n. 2, p. 53-56, 2002.
- 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 22, p. 13-18, 2002.
- SPIPKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; FRANCO, A.C.; et al. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 22, p. 58-63, 2002.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- 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. *Pesquisa Veterinária Gaúcha*, v. 4, p. 61-65, 1998.
- TIKOO, S.K.; FITZPATRICK, D.R.; BABIUK, L.A.; et al. Molecular cloning, sequencing and expression of functional bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV in transfected bovine cells. *Journal of Virology*, v. 64, p. 5131-5142, 1990.
- TORRES, M.B.; KOMMERS, G.D.; DANTAS, A.F.M.; et al. Redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) poisoning of cattle in southern Brazil. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 39, p. 94-96, 1997.
- TRIOLA, M.F. Introdução à Estatística. Rio de Janeiro: LTC, 1998.
- TURIN, L. & RUSSO, S. BHV-1 infection in cattle: na update. *Veterinary Bulletin*, v. 8, p. 15R-21R, 2003.
- VAN-DER-LEEK, M.L.; BECKER, H.N.; PIRTLE, E.C.; et al. Prevalence of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus antibodies in feral swine in Florida. *Journal of Wildlife Disease*, v. 29, p. 403-409, 1993.
- VAN ENGELENBURG, F.A.C.; MAES, R.K.; VAN OIRSCHOT, J.T. et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 3129-3135, 1993.
- WHITBECK, J.C., BELLO, L.J., LAWRENCE, W.C.M. Comparison of the bovine herpesvirus type 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 B gene. *Journal of Virology*, v. 62, p. 3319-3327, 1988.
- WILDY, P. Herpesvirus. *Intervirology*, v. 25, p. 117-140, 1986.
- WU, S.X.; ZHU, X.P.; LETCHWORTH, G.J. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the UL 49.5 protein. *Journal of Virology*, v. 72, p. 3029-3036, 1998.
- YAMAMOTO, Y.; MURAKAMI, K.; NAKANE, T.; et al. Characterization of a bovine herpesvirus type 4 isolated from the spinal cord of a cow with astasia. *Archives of Virology*, v. 145, p. 2363-2370, 2000.
- YOON, H.; EO, S.; ALEYAS, A.G.; et al. Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *Virology*, v. 68, p. 143-148, 2006.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Anexo I



Formulário único de requisição de exames para síndrome neurológica

N° _____ /MG
 Uso do Laboratório

Veterinário responsável: _____ CRMV- _____
 Endereço: _____ Município: _____ UF: _____
 Telefone: () _____ Fax: () _____
 E-mail: _____

Proprietário: _____
 Propriedade: _____ Coordenadas _____
 Localização: _____
 Município: _____ UF: _____ Telefone: () _____ FAX: () _____
 E-mail: _____

Espécie: Bovina Equina Ovina Caprina Canina Felina outras (especificar): _____
 Identificação: _____ Idade: _____ meses Sexo: macho fêmea Raça: _____
 O animal ingeriu ração em alguma fase da vida? Sim Não Quando? _____
 Havia outras espécies afetadas? Sim Não Quais? _____
 Número de animais: no rebanho () doentes () mortos ()
 O animal morto já foi vacinado para: Raiva Clostridiose Outras Quando? _____

Origem da notificação: Proprietário Terceiro Vigilância data da notificação: ____/____/____
 Data da 1ª visita: ____/____/____ data provável do início da doença: ____/____/____
 Tipos de sinais clínicos apresentados:

Morte súbita..... <input type="checkbox"/>	Movimento de pedalagem..... <input type="checkbox"/>	Paralisia flácida dos membros posteriores..... <input type="checkbox"/>
Depressão..... <input type="checkbox"/>	Convulsão..... <input type="checkbox"/>	Paralisia flácida dos membros anteriores..... <input type="checkbox"/>
Ataxia..... <input type="checkbox"/>	Dismetria..... <input type="checkbox"/>	Alteração comportamental..... <input type="checkbox"/>
Com paralisia, mas alerta <input type="checkbox"/>	Tremores..... <input type="checkbox"/>	Fotofobia/aerofobia..... <input type="checkbox"/>
Cegueira..... <input type="checkbox"/>	Nistagmo..... <input type="checkbox"/>	Sialorreia..... <input type="checkbox"/>
Incoordenação..... <input type="checkbox"/>	Tensemo..... <input type="checkbox"/>	Midriase..... <input type="checkbox"/>
Tetania..... <input type="checkbox"/>	Apetite anômalo..... <input type="checkbox"/>	Nistagmo..... <input type="checkbox"/>
	Esparmos musculares..... <input type="checkbox"/>	Agressividade..... <input type="checkbox"/>
		Opistótomos..... <input type="checkbox"/>

Duração dos sinais clínicos (desde o início até a morte): _____ horas Sacrificado: Sim Não
 Haviam animais que se recuperaram dos sinais clínicos? Sim Não Que percentual? _____ %
 Houve Contato direto de pessoas com os animais suspeitos? Sim Não

Data da coleta: ____/____/____ data do envio para o Laboratório: ____/____/____
 Tipo de amostra encaminhada: encéfalo medula cerebelo bulbo tronco encefálico outras: _____
 Dia e hora provável da morte: ____/____/____ às _____:_____
 Tempo decorrido entre a morte e a coleta do material: _____ horas
 Tempo decorrido entre a morte e a fixação do material _____ horas às _____:_____
 Material conservado em: _____

Observações:

Local/data: _____

Assinatura

ANEXO 2

INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA PARA A DOENÇA DE AUJESZKY

Laboratório de Saúde Animal do IMA/Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE E PROPRIETÁRIO

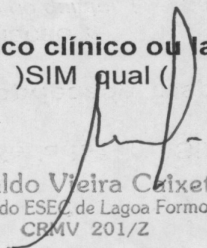
Nome da propriedade: Fazenda Carranças
Nome do proprietário: Jairo Jose Pereira
Município: Lagoa Formosa
Endereço: Juca Limirio 265

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO

Nome: Nivaldo Vieira Caixeta
Endereço: galo Carneiro 369
Telefone: 3824.2847

DIAGNÓSTICO EDUCATIVO SANITÁRIO – DOENÇA DE AUJESZKY

1. Há criação de suínos na região? SIM () NÃO
2. Existe abatedouros de suínos na região? () SIM NÃO
3. Se há criação de suínos na região, qual o tipo da criação?
() autônoma, () integrada, () fundo de quintal, () para consumo próprio
4. Há criação de suínos na propriedade? SIM () NÃO
5. Se há criação de suínos na propriedade, responda as perguntas de A a D:
- A. Qual o tipo da sua criação ?
() autônoma, () integrada, () fundo de quintal, () para consumo próprio
- B. Há quantos anos você cria suínos nesta propriedade?
() um a 2 anos, () três a 4 anos, () cinco a 7 anos, () oito a 10 anos, () onze a 12 anos,
() treze a 15 anos, () dezesseis a 18 anos, () acima de 19 anos.
- C. Você tem tido casos de porcas que abortam, nascimento de leitões mortos ou fetos mumificados?
() raramente, () freqüentemente, () não
- D. Possui outros animais domésticos em contato direto ou indireto com suínos?
() gatos, () cães, () bovinos, () ovinos e caprinos, () galinhas caipiras, () pombos
() outros (quais _____), () nenhum
6. Foi notado sinais nervosos em outros animais da propriedade?
() gatos, () cães, () bovinos, () ovinos e caprinos, () galinhas caipiras, () selvagens
() quais(_____), () outros (quais _____),
() nenhum
7. Houve algum tipo de diagnóstico clínico ou laboratorial para a Doença de Aujeszky na região? NÃO () SIM qual (_____)


Nivaldo Vieira Caixeta
Chefe do ESEZ de Lagoa Formosa
CRMV 201/Z