



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PRESENÇA DO GENOMA DE HERPESVIRUS BOVINO 5 E DO HERPESVIRUS
BOVINO 1 NO SNC DE BOVINOS SADIOS, PORTADORES DE
MENINGOENCEFALITE HERPÉTICA E OUTRAS ENCEFALOPATIAS**

LILIAN AZEVEDO FIGUEIREDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**PRESENÇA DO GENOMA DE HERPESVIRUS BOVINO 5 E DO HERPESVÍRUS
BOVINO 1 NO SNC DE BOVINOS SADIOS, PORTADORES DE
MENINGOENCEFALITE HERPÉTICA E OUTRAS ENCEFALOPATIAS**

LILIAN AZEVEDO FIGUEIREDO

**ORIENTADOR: JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES
CO-ORIENTADOR: JÚLIO AUGUSTO NAYLOR LISBÔA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO 16/2009

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2009**


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**PRESENÇA DO GENOMA DE HERPESVIRUS BOVINO 5 E DO HERPESVÍRUS
BOVINO 1 NO SNC DE BOVINOS SADIOS, PORTADORES DE
MENINGOENCEFALITE HERPÉTICA E OUTRAS ENCEFALOPATIAS**

LILIAN AZEVEDO FIGUEIREDO

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL**

APROVADA POR:



JOSE RENATO JUNQUEIRA BORGES, Doutor (Universidade de Brasília)
(ORIENTADOR)



SIMONE PERECMANIS, Doutora (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO)



AMAURI ALCINDO ALFIERI, Doutor (Universidade Estadual de Londrina)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 11 de DEZEMBRO de 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

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

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Figueiredo, Lilian Azevedo

Presença do genoma do herpesvirus bovino 5 e do herpesvirus bovino 1 no SNC de bovinos sadios, portadores de meningoencefalite herpética e outras encefalopatias. / Lilian Azevedo Figueiredo orientação de José Renato Junqueira Borges – Brasília, 2009. 63 p.: il. Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

1. herpesvirus bovino 5. 2. herpesvirus bovino 1 3. Encefalopatias. 4. PCR 5. SNC

DEDICATÓRIA

A todos que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. José Renato Junqueira Borges e Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa, pela orientação e co-orientação neste projeto e por todo ensinamento e apoio.

À Dra. Kerlei Médici, responsável técnica pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, pela disponibilidade, paciência e carinho com que sempre me atendeu e pela orientação na metodologia, sem a qual não teria sido possível a concretização deste trabalho.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina que colaboraram para realização deste projeto.

Ao professor Dr. Amauri Alfieri, por disponibilizar o Laboratório de Virologia Animal e todo material necessário para o processamento de todas as amostras.

A todos os amigos que torceram por mim.

A minha família, por todo amor, carinho, apoio e confiança sempre depositada em mim, sem a qual não teria chegado até aqui.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	x
RESUMO EM PORTUGUÊS.....	xii
RESUMO EM INGLÊS.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
Descrição dos agentes.....	3
1. Herpesvírus bovino 1.....	5
2. Herpesvírus b*ovino 5.....	8
3. Diagnóstico.....	11
4. Diagnóstico molecular.....	12
OBJETIVOS.....	14
OBJETIVO GERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO II.....	20
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
Amostras biológicas.....	22
Determinações laboratoriais	23
Extração do DNA.....	23
PCR.....	24
PCR diferencial BoHV-1 e BoHV-5 - (Multiplex-PCR).....	25
RESULTADOS.....	27
Universidade de Brasília.....	27
Universidade Estadual de Londrina.....	28
Matadouro.....	30

DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO III.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
ANEXOS.....	42
Anexo I: Soluções e Tampões.....	42
Anexo II: Lista de Reagentes.....	46
Anexo III: Protocolo de extração do DNA.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados das M-PCR para detecção do DNA de BoHV-5 das amostras da Universidade de Brasília	Página	27
Tabela 2: Resultados das M-PCR para detecção do DNA de BoHV-5 das amostras da Universidade Estadual de Londrina	Página	29
Tabela 3: Resultados das M-PCR para detecção do DNA de BoHV-5 das amostras providas do matadouro.	Página	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultado da M-PCR para a detecção do DNA de BoHV-5 em gel de agarose a 2% das amostras da Universidade de Brasília	Página	28
Figura 2: Resultado da M-PCR para a detecção do DNA de BoHV-5 em gel de agarose a 2% das amostras da Universidade de Londrina.	Página	30
Figura 3: Resultado da M-PCR para a detecção do DNA de BoHV-5 em gel de agarose a 2% das amostras do matadouro.	Página	31

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
BoHV-1	Herpesvírus bovino 1
BoHV-5	Herpesvírus bovino 5
DCJ	Doença de Creutzfeldt Jakob
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos 5'- trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEB	Encefalite Espongiforme Bovina
HV-Uel	Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina
HV-UnB	Hospital Veterinário da Universidade de Brasília
IBR	Rinotraqueíte Infeciosa Bovina
IPB	Balanopostite Pustular Bovina
IPV	Vulvovaginite Pustular Bovina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimoles

M-PCR	Multiplex PCR
NaCl	Cloreto de sódio
N-PCR	Nested PCR
nt	Nucleotídeo
°C	Graus Celsius
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> = Tampão Salino-fosfato
PCR	Reação da polimerase em Cadeia
Ph	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomoles
PNCRH	Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
UV	Ultravioleta
VDVB	Vírus da diarreia viral bovina

RESUMO EM PORTUGUÊS

Os herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são vírus de DNA de fita dupla, com envelope glicoprotéico, que pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. A principal propriedade biológica dessa subfamília é a capacidade de estabelecer latência após a infecção aguda, quando não é possível sua detecção, exceto quando são utilizadas técnicas moleculares de hibridização *in situ* e a reação em cadeia pela polimerase (PCR). O BoHV-1 é principalmente atribuído a problemas respiratórios e reprodutivo e raramente à encefalite, como o BoHV-5. Dificuldades de isolamento do BoHV-5 têm sido descritas, o que torna a PCR um importante meio de diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da técnica da PCR para a detecção do BoHV-5 e do BoHV-1 em SNC de bovinos com encefalite por BoHV-5, com outras encefalopatias e normais. Foram utilizadas amostras de SNC de bovinos atendidos nos Hospitais Veterinários da Universidade de Brasília (HV-UnB) e da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), além de amostras de matadouros. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para o BoHV-1. Das amostras positivas para o BoHV-5, foram 21 das 68 (30,88%) provenientes do HV-UnB, 2 das 30 (7%) provenientes do matadouro e 2 de 17 (11,76%) provenientes do HV-UEL. Dos 21 animais positivos do HV-UnB 3 casos foram de amostras de animais sem diagnóstico conclusivo, 7 casos de animais com diagnóstico confirmado de raiva, 7 casos com encefalite por BoHV-5, 1 caso de animal com polioencefalomalácia, 1 caso de animal com botulismo, 1 caso de animal com encefalite bacteriana e 1 caso de animal com carbúnculo sintomático. Das amostras positivas provenientes do HV-UEL todas eram de animais com diagnóstico de encefalite por BoHV-5 e do matadouro eram de animais saudáveis. A PCR para detecção do genoma do BoHV-5 em bovinos com encefalopatia não deve ser utilizada isoladamente no diagnóstico, e sim associada aos sinais clínicos, histopatologia, isolamento e imunoistoquímica.

PALAVRAS-CHAVE: 1. Herpesvirus bovino 5. 2. Herpesvirus bovino 1 3. Encefalopatias. 4. PCR 5. SNC

RESUMO EM INGLÊS

Bovine herpesvirus 1 and 5 are enveloped double-stranded DNA viruses belonging to the *Herpesviridae* family, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*. This family major property is to establish a lifelong latent infection after acute infection, when it is not possible to detect the virus, except when molecular techniques as situ hybridization and polymerase chain reaction are used. BoHV-1 is primarily associated with respiratory and reproductive disease in cattle, while BoHV-5 is commonly associated to encephalitis. Difficulties in isolation of BoHV-5 have been described, which makes PCR an important tool of diagnosis. The aim of this study was to evaluate the applicability of PCR assay for the detection of BoHV-1 and BoHV-5 in CNS of bovines with meningoencephalitis, other encephalitis and healthy animals. For the present study, brain fragments samples of bovines were obtained from necropsy routine at Veterinary Hospital of University of Brasília (Hv-UnB) and State University of Londrina (HV-UEL), besides slaughterhouse samples. All CNS fragments were negative for BoHV-1. In 21 of 68 (30,88%) samples from Hv-UnB, 2 of 30 (7%) samples from slaughterhouse and 2 of 17 (11,76%) samples from HV-UEL the results were positive for BoHV-5. Among the 21 positive animals from HV-UnB, 3 where from samples of non-conclusive diagnosis cases, 7 from confirmed rabies diagnosis, 7 from animals with BoHV-5 encephalitis, 1 case of polioencephalomalacia, 1 animal with botulism, 1 with bacterial encephalitis and 1 animal with carbunculus. All positive samples from HV-UEL were from animals with BoHV-5 encephalitis diagnosis and from the slaughterhouse all animals were healthy. The PCR detection of BoHV-5 genome in bovines with encephalopathies must not be used alone as diagnosis but associated with clinical signs, histopathological findings, isolation and immunohistochemistry

Key-Words: 1. Bovine herpesvirus 1 2. Bovine herpesvirus 5 3. Neurological diseases .
4. PCR 5. CNS

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os distúrbios neurológicos em bovinos abrangem um grupo de enfermidades muito importantes, tanto pelo perigo em potencial que representam para a saúde humana, quanto pelas expressivas perdas econômicas que ocasionam. Dois aspectos importantes envolvem as neuropatias: frequência e dificuldade de diagnóstico, esta última ligada à variação de manifestação clínica de uma mesma doença, à semelhança sintomatológica existente entre algumas delas e, em vários casos, à falta de estrutura técnica dos laboratórios para diagnóstico (AQUINO NETO et al., 2009).

A importância das doenças do sistema nervoso de bovinos cresceu desde o aparecimento, há cerca de 20 anos, da encefalopatia espongiforme bovina (EEB). Aproximadamente 10 anos após o aparecimento da EEB, o consumo de carne e derivados foi associado ao surgimento, em humanos, de uma enfermidade semelhante à Creutzfeldt Jakob (CJD), passando então a EEB a ser considerada zoonose. Após o aparecimento desta doença, países importadores de carne passaram a bloquear as importações de países que tiveram a doença ou que não tivessem dados concretos sobre a prevalência das doenças do sistema nervoso central (SNC) em seu rebanho bovino (BARROS et al., 2006).

Devido às significantes perdas na indústria bovina como resultado da infecção distribuída mundialmente pelos herpesvírus bovinos, as Comunidades Americana e Européia têm imposto estrito controle sanitário de sêmen e embriões, estabelecendo programas de erradicação que afetam diretamente o comércio bovino mundial. O Brasil, como maior exportador de carne bovina para a Europa e Ásia, deve se atentar a uma detalhada revisão de seus programas sanitários (FERRARI et. al., 2007)

Autoridades sanitárias internacionais estão solicitando aos países exportadores de carne, como é o caso do Brasil, que apresentem evidências de

que seus rebanhos são considerados como risco desprezível de adquirir EEB. Isso equivale a dizer que os países devem estar capacitados a identificar outras doenças que afetam o SNC de bovinos, mesmo na ausência de casos de EEB (BARROS et al., 2006).

O diagnóstico diferencial das encefalopatias de bovinos é parte fundamental da vigilância da EEB, coordenada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituído em 1966.

Este diagnóstico diferencial sempre se impõe como um desafio ao clínico e o apoio laboratorial criterioso é indispensável nestes casos. O diagnóstico *ante mortem* é difícil de ser realizado devido à ausência de sinais clínicos patognomônicos da maioria das doenças neurológicas. Por este motivo, o diagnóstico *post mortem* com auxílio de métodos laboratoriais se torna indispensável (HALFEN; VIDOR, 2001).

REFERENCIAL TEÓRICO

Descrição dos agentes

Os herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são vírus de DNA de fita dupla, com envelope glicoprotéico, que pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, juntamente com outros importantes alfa herpesvírus de importância veterinária (ANDRADE, 2005; FERRARI et al., 2007).

A principal propriedade biológica dessa subfamília é a capacidade de estabelecer latência em neurônios dos gânglios sensoriais após a infecção aguda, onde o DNA viral pode persistir sob a forma de concatâmeros nos núcleos das células infectadas (CARON et al., 2002; ESTEVES, 2007; FERRARI et al., 2007; SILVA et al., 1998). A infecção latente é uma importante estratégia de perpetuação dos alfa herpesvírus nos seus hospedeiros e provavelmente, ocorre em todos os animais após uma infecção primária. Embora os principais sítios de latência sejam os gânglios sensoriais, têm sido sugerido que sítios não neuronais como tonsilas, células sanguíneas, linfonodos e baço possam ter importância no estabelecimento e reativação de infecções latentes por BoHV-1 (CAMPOS, 2009).

Os alfa herpesvírus estabelecem latência viral em células ganglionares, especialmente nos animais que sobrevivem à infecção aguda, que após uma situação de estresse como transporte, parto, desmama, confinamento ou pelo tratamento sistêmico com corticóides pode ser reativado, ocorrendo episódios de doença aparente, inflamação assintomática e reexcreção viral (BELKNAP et al., 1994; CARON et al., 2002; COLODEL et al., 2002; HALFEN; VIDOR, 2001; MEYER et al., 2001; SILVA et al., 1999). Desta maneira, animais com infecção latente atuam como reservatório natural do vírus durante toda a sua vida (ESTEVES, 2007).

No período de latência não é possível a detecção do vírus, exceto quando são utilizadas técnicas moleculares de hibridização *in situ* e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que são capazes de detectar o DNA viral e identificar sítios de latência (SILVA et al., 1999).

O BoHV-1 e o BoHV-5 compartilham diversas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares e apresentam homologia de cerca de 85% do genoma (DELHON et al., 2003). A similaridade genotípica e fenotípica entre estes dois vírus pode acarretar em implicações epidemiológicas. Nesse sentido, a disponibilidade de técnicas para diferenciar os dois vírus, bem como uma delimitação mais precisa das manifestações clínicas associadas a cada um deles são importantes para o diagnóstico e controle dessas infecções (SÁ e SILVA et al., 2007).

O mais importante fator de risco para a infecção é a introdução no rebanho de animais em período de incubação, em fase aguda, ou latentemente infectados pelo vírus. Estas situações normalmente ocorrem em propriedades que têm como característica uma criação mais aberta à exposição, estando seu rebanho sempre em contato com outros, quer seja por participação em eventos agropecuários ou através da utilização de pastagem em comum (BARBOSA ET al., 2005).

Os primeiros isolamentos de herpesvírus a partir de animais com sinais de encefalopatia, por carência de métodos adequados para a caracterização viral, foram atribuídos ao BoHV-1, agente etiológico dos quadros de rinotraqueíte, vulvovaginite, devido a similaridades na morfologia viral, nos efeitos citopáticos em cultura de células e nas propriedades antigênicas. Posteriormente, estudos baseados em mapeamentos de DNA, testes de neutralização cruzada e reatividade de anticorpos monoclonais definiram que os vírus se diferem em propriedades genômicas e antigênicas (DELHON et.al., 2003).

O BoHV-1 e o BoHV-5 replicam de forma semelhante na mucosa nasal após a inoculação, mas diferem no potencial neuropatogênico. A infecção do epitélio nasal pelo BoHV-1 e BoHV-5 é seguida pela invasão de terminações nervosas dos neurônios que se localizam na mucosa nasal. Os alfa herpesvírus neurotrópicos, o BoHV-5 e o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), invadem terminações dos nervos olfatório e trigêmeo na mucosa nasal e alcançam o bulbo olfatório e gânglios trigêmeos. Estas duas rotas representam o principal caminho para a neuroinvasão viral em direção ao SNC. Por outro lado, o BoHV-1 se detém à rota trigemeal e geralmente estabelece infecção latente em

gânglios trigêmeos, sendo somente esporadicamente responsável por encefalites (CAMPOS, 2009).

A infecção pelo BoHV-1 geralmente determina alta morbidade e baixa mortalidade, já a infecção pelo BoHV-5 costuma se apresentar com baixa morbidade e alta letalidade (SOUZA et al., 2002).

2.1 Herpesvirus bovino 1

O Herpesvírus bovino 1 é um dos patógenos mais importantes dos bovinos e causa grandes perdas econômicas na pecuária mundial (TAKIUCHI et al., 2003; BARBOSA et al., 2005). É um vírus de distribuição mundial e sua prevalência em rebanhos bovinos atinge coeficientes variados em diferentes regiões. No Brasil, os coeficientes de soropositividade variam de 10,6 a 96% (BARBOSA et al., 2005).

O BoHV-1 é o agente etiológico de diversas manifestações clínicas nos rebanhos tanto de leite como de corte, tais como, a rinotraqueíte (IBR), conjuntivite e ceratoconjuntivite e várias formas de problemas reprodutivos, como mortalidade embrionária e fetal, abortamento, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos, vulvovaginite (IPV) e balanopostite (IPB), (ALEGRE et al., 2001; TAKIUCHI et al., 2003), sendo raros os relatos deste agente causando encefalite (ANDRADE, 2005). Este motivo levou os pesquisadores a buscarem a melhor caracterização das amostras isoladas dos diferentes quadros clínicos. Especula-se que cada genótipo esteja melhor adaptado a uma determinada localização anatômica. Assim, o BoHV-1.1 multiplica-se melhor no trato respiratório, enquanto que o BoHV-1.2 multiplica-se, preferencialmente, no trato genital (ESTEVES, 2007).

O vírus provoca doença mediante vários caminhos diferentes, como infecção primária restrita ao trato respiratório, olhos e trato reprodutivo. Ocorre disseminação sistêmica para muitos órgãos por viremia, bem como por disseminação neuronal (RADOSTITS et al., 2002).

A replicação no sítio primário de infecção resulta em uma massiva produção de vírus. A disseminação viral nos tecidos pode ocorrer por dois

caminhos: os vírus saem para o meio extracelular e vão infectar novas células e/ou ocorre uma disseminação célula a célula. As novas progênies virais são excretadas na mucosa nasal em altos títulos, sendo este o fator responsável por uma rápida disseminação da infecção dentro de um rebanho (CAMPOS, 2009).

Em adultos, o BoHV-1 pode causar somente sinais clínicos brandos, mas em animais jovens, incluindo os recém-nascidos, pode ser o responsável por problemas mais graves como, por exemplo, dar início à doença respiratória de bovinos, pela sua habilidade em modificar o ambiente do trato respiratório superior e causar imunossupressão. O BoHV-1 encontra-se difundido por todo o mundo, incluindo o Brasil (ANDRADE, 2005). Cada rebanho infectado parece ter uma forma predominante da doença, mas alguns animais também podem demonstrar sinais de outras formas durante uma epidemia (REBUN, 2000).

A prevalência das infecções pelo BoHV-1 em rebanhos brasileiros está em torno de 30%, sendo que grande parte das propriedades apresenta animais sorologicamente positivos (ANDRADE, 2005).

2.1.1 Forma respiratória

A IBR é a forma clássica da doença provocada pelo BoHV-1 (CAMPOS, 2009). O vírus infecta as cavidades nasais e o trato respiratório superior resultando em rinite, laringite e traqueíte (RADOSTITS et al., 2002). A infecção respiratória pelo BoHV-1 é a mais comum e pode ocorrer sozinha, ou em conjunto com a conjuntiva (REBUN, 2000).

A forma não-complicada da doença respiratória em bovinos não é altamente fatal, sendo a maioria das perdas devidas, principalmente, a uma broncopneumonia bacteriana secundária (RADOSTITS et al., 2002).

A forma respiratória associa-se a alta morbidade e baixa mortalidade (REBUN, 2000), sendo essas taxas mais elevadas em bovinos de engorda do que em rebanhos leiteiros por causa da frequente introdução de animais suscetíveis. As fontes principais de infecção são o exsudato nasal e gotículas

de saliva, secreções genitais, sêmen, bem como líquidos e tecidos fetais (RADOSTITS et al., 2002).

Os animais infectados mostram sinais clínicos durante 7 a 14 dias e se recuperam com o tempo, a menos que sobrevenha uma infecção secundária. Os principais sinais clínicos incluem descarga nasal que evolui de serosa a mucopurulenta, febre alta, depressão, anorexia e presença de crosta necrótica ressecada no focinho (REBUN, 2000).

2.1.2 Forma reprodutiva

O BoHV-1 é o patógeno mais comumente encontrado no sêmen bovino, sendo associado a redução de fertilidade e desenvolvimento fetal anormal (MOORE et al., 2000).

A vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) não é muito observada e se manifesta como placas, erosões, úlcera e inflamação nas membranas vaginais e vulvares (REBUN, 2000). Esta doença normalmente é descoberta quando a fêmea levanta a cauda para realizar o ato de micção ou defecação e demora a retorná-la à posição original. O exame interno revela pústulas ou placas de material necrótico branco e material mucopurulento no assoalho vaginal (CAMPOS, 2009).

A afecção pode se alastrar através do coito a partir de touros infectados com balanopostite pustular infecciosa (IPB). Nos machos a enfermidade é caracterizada por lesões avermelhadas no prepúcio ou no pênis que tendem a formar pápulas, vesículas ou pústulas ou pelo uso de sêmen infectado (CAMPOS, 2009; REBUN, 2000).

Um dos efeitos mais graves relacionados aos problemas reprodutivos causados pelo BoHV-1 pode ser observado em animais prenhes (ANDRADE, 2005). O vírus pode ser transportado por leucócitos periféricos para a placenta e transferido ao feto, que é altamente suscetível ao vírus, que apresenta uma infecção hiperaguda geralmente fatal, causando o aborto principalmente no terço final da gestação (RADOSTITS et al., 2002; ANDRADE, 2005).

Podem ocorrer abortos associados a qualquer forma da doença, durante a fase aguda ou nas semanas seguintes a uma epidemia (REBUN, 2000).

2.1.3 Forma ocular

A forma conjuntival coexiste, por vezes, com a forma respiratória (REBHUN, 2000). A disseminação a partir das cavidades nasais para os tecidos oculares provavelmente ocorre por meio dos ductos lacrimais (RADOSTITS et al., 2002) e causa conjuntivite com edema e tumefação da conjuntiva, formação de placa multifocal nas conjuntivas, edema corneal periférico, vascularização profunda, descarga ocular serosa, que se torna mucopurulenta dentro de 2 a 4 dias (REBUN, 2000; RADOSTITS et al., 2002).

2.2 Herpesvirus bovino 5

A infecção pelo herpesvírus bovino 5 causa meningoencefalite herpética em bovinos de todas as faixas etárias, principalmente nos jovens. No Brasil, encefalites causadas pelo BoHV-5 têm sido confirmadas de forma crescente nos rebanhos, sendo considerada a segunda maior causa de encefalite com etiologia determinada em bovinos, sendo a primeira a raiva (SOUZA et al., 2002; SANCHES et al., 2000).

Surtos de meningoencefalite causados pelo BoHV-5 foram descritos na Austrália (1962), Estados Unidos (1963, 1974), Canadá (1975), Hungria (1969), Argentina (1983) e Uruguai (1982). Embora previamente atribuída ao BoHV-1, a encefalite pelo BoHV-5 vem sendo descrita no Rio Grande do Sul desde 1987, acometendo bezerros de menos de um mês de idade, bezerros recém desmamados e de até 2,5 anos de idade (SALVADOR et al., 1998). Existem casos descritos também nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais (SOUZA et al., 2002), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Mato Grosso do Sul, São Paulo (SALVADOR et al., 1998), Pará (Riet-Correa et al., 2006), Distrito Federal e Paraná (CLAUS, 2002) e há indícios de que seja enzoótica em todo o país.

A patogenia da infecção pelo BoHV-5 não é completamente conhecida. A contaminação, provavelmente, ocorre nos primeiros dias de vida, uma vez

que atinge principalmente animais jovens (SPILKI et al., 2006). As principais portas de entrada do vírus são as superfícies mucosas do trato respiratório. A transmissão é, geralmente, associada ao contato íntimo com essas superfícies e suas secreções, mas o vírus também pode ser propagado por meio de aerossóis (HALFEN; VIDOR, 2001). Após a penetração pela via nasal, o BoHV-5 replica na mucosa do trato respiratório superior produzindo sinais respiratórios leves a moderados. A replicação primária na mucosa nasal pode persistir por mais de 15 dias e, frequentemente, é seguida de invasão e replicação viral no SNC, resultando em meningoencefalite herpética não supurativa (DIEL et al., 2005).

O BoHV-5 tem a capacidade de invadir e se replicar em áreas profundas do encéfalo durante a infecção aguda e como nem toda infecção é fatal, o vírus pode permanecer latente em algumas destas áreas. DNA do BoHV-5 tem sido detectado frequentemente no gânglio do nervo trigêmeo, e ocasionalmente em outras áreas do encéfalo e traquéia de animais experimentalmente infectados. Durante a infecção aguda, o vírus pode ser encontrado em diversas regiões do encéfalo, em títulos altos a moderados (VOGEL et al., 2003).

A disseminação do vírus no sistema nervoso, a partir de uma infecção primária, ocorre através da penetração via neurônios sensoriais periféricos (ESTEVES, 2007). A rota de infecção do SNC ainda não é definida, embora tanto a rota de nervo olfatório quanto a trigemeal têm sido descritas (DELHON et al., 2003).

O curso da doença, após infecção experimental, depende da rota de inoculação, do estado imune e da idade do animal, além da virulência da estirpe viral infectante. Animais de até 4 meses de idade são os mais susceptíveis. Durante a primeira semana pós-inoculação intranasal, os animais apresentam sinais de rinite, conjuntivite ou mesmo se mantêm assintomáticos. Neste ponto, os animais podem se recuperar da infecção, progredir para doença neurológica ou morrer (DELHON et al., 2003).

Geralmente esta infecção é fatal, porém em alguns casos de infecções agudas e na dependência do sítio de replicação do vírus no cérebro, essa infecção pode ser assintomática com estabelecimento de latência viral, podendo o vírus ser detectado em várias regiões do cérebro. No entanto,

somente animais com infecções sintomáticas apresentam títulos sorológicos, sejam altos ou moderados (BELTRÃO et al., 2000).

2.2.1 Sinais Clínicos

Os principais sintomas neurológicos geralmente aparecem a partir do dia 9 ou 10 pós-infecção e incluem nistagmo, bruxismo, opistótono, amaurose, sialorréia, andar em círculos, ataxia, tremores musculares e convulsões. Os sinais neurológicos são progressivos e geralmente resultam em morte. O período de evolução da doença é de 1 a 15 dias, sendo mais comum entre 4 e 7 dias (SALVADOR et al., 1998; SANCHES et al., 2000; COLODEL et al., 2002; ELIAS; SCHILD; RIET CORREA, 2004; DIEL et al., 2005; ISERNHAGEN, 2005).

Vogel et al. (2003) encontraram DNA de BoHV-5 em diversas áreas do SNC, além do gânglio do nervo trigêmeo, em animais com infecção latente experimentalmente contaminados. O DNA foi frequentemente encontrado no córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo, ponte e cerebelo e, menos frequentemente, no bulbo olfatório.

2.2.2 Achados de necropsia/ histopatologia

À necropsia normalmente não existem alterações significativas. As alterações histológicas com infiltrado de células mononucleares e áreas de malácia são características, variam em gravidade e não se distribuem uniformemente pelo encéfalo (ISERNHAGEN, 2005). Salvador et AL. (1998) relataram achados inespecíficos como congestão, áreas de malácia, achatamento das circunvoluções, protusão do cerebelo pelo forâmen magno e pontos hemorrágicos no córtex cerebral.

A principal alteração histológica encontrada no SNC é uma meningoencefalite difusa, não-supurativa, associada à necrose neuronal maciça, atingindo grandes extensões do córtex, não apresentando padrão laminar, mas envolvendo todas as camadas corticais. Estas áreas são caracterizadas pela presença de neurônios acentuadamente eosinofílicos,

retraídos, com aumento do espaço perineural (ELY et al., 1996; SALVADOR et al., 1998; CARON et al., 2002; D'ARCE et al., 2002; FERRARI et al., 2007;).

A distribuição da necrose neuronal, envolvendo todas as camadas corticais, encontrada nas infecções com o BoHV-5, mostra-se diferente daquela necrose laminar profunda ou intermediária tradicionalmente reconhecida como polioencefalomalácia. Outra diferença importante é a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares, localizados, principalmente, nas áreas de necrose neuronal. Isso demonstra necessidade de um estudo microscópico detalhado de todos os segmentos do encéfalo para diferenciar estas duas doenças (SALVADOR et al., 1998).

2.3 Diagnóstico

A elevação das células mononucleares no líquido é a alteração mais importante como auxílio do diagnóstico ainda em vida. As alterações no leucograma são discretas e inespecíficas (ISERNHAGEN, 2005).

Dentre os métodos diagnósticos para detecção do BoHV-1 e BoHV-5, estão o isolamento viral, sorologia e ensaios imunoenzimáticos, porém todas estas técnicas dependem de uma boa qualidade da amostra e da viabilidade viral (MOORE et al., 2000).

Em rebanhos vacinados contra o BoHV-1, os métodos de diagnóstico sorológico tradicionais apenas indicam a presença da infecção, não podendo ser empregados para a realização do diagnóstico conclusivo. Outro inconveniente inclui a soroconversão pós-vacinal em animais imunizados com vacinas produzidas por metodologias tradicionais, nos quais não é possível diferenciar os resultados sorológicos positivos ocasionados pela infecção natural, daqueles resultantes da vacinação (TAKIUCHI et al., 2003).

O isolamento viral é a técnica padrão para o diagnóstico do BoHV-1 e do BoHV-5, porém é uma técnica trabalhosa e necessita da manutenção de cultivo celular e estoque de vírus. Após um período variável de incubação, a presença do vírus é evidenciada pelo efeito citopático característico do vírus. Obtêm-se o resultado dentro de 3 a 5 dias, porém não permite diferenciação clara entre

BoHV-1 e BoHV-5. As técnicas imunológicas, com detecção de antígenos, apesar de não exigirem a infecciosidade da partícula viral, exigem a integridade da mesma. Com isso, as formas de conservação, e mesmo de transporte, das amostras podem ser de fundamental importância para o sucesso diagnóstico etiológico conclusivo (TAKIUCHI et al., 2003; FERRARI et al., 2007).

A imunohistoquímica é geralmente a primeira escolha para o diagnóstico. No entanto, o uso de anticorpos monoclonais para a detecção de antígenos específicos, a partir de amostras de necropsias, se torna inviável devido à grande quantidade de amostras a serem avaliadas e ao alto custo dos reagentes (FERRARI et al., 2007).

2.4 Diagnóstico molecular

Dificuldades de isolamento do BoHV-5 mesmo em condições experimentais, principalmente associadas à infecção latente, têm sido descritas, o que torna a PCR um importante meio de diagnóstico (BARROS et al., 2006). Esta técnica tem se tornado uma importante ferramenta para os virologistas veterinários (MOORE et al., 2000; TAKIUCHI et al., 2003), pois a mesma indica a presença do genoma viral e não a atividade do vírus e não exige a viabilidade da partícula viral, possibilitando o diagnóstico em materiais biológicos de animais de produção, coletados a campo, que nem sempre são conservados adequadamente (CLAUS, 2002); além disso, apresenta como vantagem a rapidez na obtenção dos resultados e, quando devidamente padronizada, altas taxas de sensibilidade e especificidade (TAKIUCHI et al., 2003; FERRARI et al., 2007).

O uso da técnica da PCR específica para BoHV-5 para o diagnóstico de doenças neurológicas em bovinos deve ser feito com cautela, pois animais com infecções latentes e que sofram de alguma outra enfermidade neurológica podem ter o diagnóstico errôneo de meningoencefalite por BoHV-5, ocultando outras doenças neurológicas importantes e com alto potencial zoonótico, como é o caso da raiva, que podem ser a real causa dos sinais clínicos do animal. Em outras palavras, a detecção do DNA do BoHV-5 em cérebros de bovinos

com sinais neurológicos sem o isolamento viral concomitante ou a detecção de antígeno viral, pode não indicar necessariamente infecção aguda por BoHV-5 (VOGEL et al., 2003).

Diversas técnicas de PCR têm sido desenvolvidas com o passar dos anos, a necessidade do desenvolvimento de metodologias capazes de diferenciar o BoHV-1 do BoHV-5 tem levado à padronização de PCR diferenciais (CAMPOS, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a presença do BoHV-5 e do BoHV-1 em uma coleção de amostras de SNC de bovinos assintomáticos e com encefalopatias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a técnica da PCR para demonstrar que bovinos sadios ou portadores de outras encefalopatias podem ser portadores de infecção latente por BoHV-5 e por BoHV-1.

- Avaliar comparativamente o percentual de amostras positivas provenientes de animais assintomáticos e com encefalopatias.

REFERÊNCIAS

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

ANDRADE, G.I. Diagnóstico sorológico de *Herpesvírus bovino 1 e 5*: Proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície. 2005. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AQUINO NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J, FERREIRA, P.M.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LOBATO, Z.I.P.; ALVARENGA, M.R.; SERRANO, A.L.; MARTINS, R.A.; AFONSO, D.A.F. Meningoencefalite por Herpesvírus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.1, p.1-5, 2009.

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

BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, A.A. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Minas Gerais: Vallée, p.03, 2006.

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

BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.; ROEHE, P.M.; IRIGOYEN, L.F. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.20, n.4, p.144-150, 2000.

CAMPOS, F.S. Detecção de infecções latentes por herpesvírus bovino 1 e 5 em gânglios trigêmeos de bovinos através da técnica de reação em cadeia da polimerase. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CLAUS, M.P. Detecção do herpesvírus bovino tipos 1 e 5 por amplificação parcial do gene da glicoproteína C e estudo retrospectivo da meningoencefalite herpética bovina. 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

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

DIEL, D.G., FONSECA, E.T., SOUZA, S.F., MAZZANTI, A., BAUERMANN, F., WEIBLE, R., FLORES, E.F. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigêmeal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25(3), p. 164-170, 2005.

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**, Rio de Janeiro, v.24, n.3, p.123-131, 2004.

ESTEVEES, P.A. Análise da região carboxi-terminal da glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5). 2007. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAMAL, P.; CARDOSO, T.C. Detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin –embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue based diagnostic test of bovine encephalitis. **Journal of Virological Methods**, v.146, n. 1-2 p. 335-340, 2007.

HALFEN, D.C.; VIDOR, T. Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2001. v.2, p. 97-108.

ISERNHAGEN, A.J. Meningoencefalite herpética em bezerros: evolução clínica e diagnóstico. 2005. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, Vienna, v.146, n.4, p.633-652, 2001.

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.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., RADOSTITS ET AL., 2002, D.C., HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária. Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA, V.D.; BRITO, M.F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará.

Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.26, n.1, p. 44-46, 2006.

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

SANCHES, A.W.D.; LONGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.113-118, 2000.

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

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

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

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIRA, R.S.; VICENTINI, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de

herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-2) e 5 (BVH-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.1, p.13-18, 2002.

SPIILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R.A.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvírus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.23, n.1, p.1-4, 2003.

SPIILKI, F.R.; SILVA, T.C.; ESTEVES, P.A.; TEICEIRA, M.B.; BATISTA, H.B.C.R.; CHIMINAZZO, C.; DRIEMEIER, D.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Co-infection with bovine herpesvirus type 5 and bovine viral diarrhoea virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.5, p.699-707, 2006.

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

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.10, p. 4512-4520, Oct. 2003.

CAPÍTULO II

PRESENÇA DO GENOMA DE HERPESVIRUS BOVINO 5 E DO HERPESVIRUS BOVINO 1 NO SNC DE BOVINOS SADIOS E PORTADORES DE MENINGOENCEFALITE HERPÉTICA E OUTRAS ENCEFALOPATIAS

INTRODUÇÃO

As encefalopatias em bovinos constituem um grupo de enfermidades importantes, geralmente fatais, que causam em todo mundo grande perda econômica (SILVA et al., 1998).

A importância das doenças do sistema nervoso de bovinos cresceu desde o aparecimento, há cerca de 20 anos, da encefalopatia espongiforme bovina (EEB). Aproximadamente 10 anos após o aparecimento da EEB, o consumo de carne e derivados foi associado ao surgimento, em humanos, de uma enfermidade semelhante à Creutzfeldt Jakob (CJD), passando então a EEB a ser considerada zoonose. Após o aparecimento desta doença, países importadores de carne passaram a bloquear as importações de países que tiveram a doença ou que não tivessem dados concretos sobre a prevalência das doenças do sistema nervoso central (SNC) em seu rebanho bovino (BARROS et al., 2006).

Devido a significantes perdas na indústria bovina como resultado da infecção distribuída mundialmente pelos BoHVs, as Comunidades Americana e Européia têm imposto estrito controle sanitário de sêmen e embriões, estabelecendo programas de erradicação que afetam diretamente o comércio bovino mundial. O Brasil, como maior exportador de carne bovina para a Europa e Ásia, deve se atentar a uma detalhada revisão de seus programas sanitários (FERRARI et al., 2007)

Autoridades sanitárias internacionais estão solicitando dos países exportadores de carne, como é o caso do Brasil, que apresentem evidências de que seus rebanhos são considerados como risco desprezível de adquirir EEB. Isso equivale a dizer que os países devem estar capacitados a identificar outras doenças que afetam o SNC de bovinos, mesmo na ausência de casos de EEB (BARROS et al., 2006).

O diagnóstico diferencial das encefalopatias de bovinos é parte fundamental da vigilância da encefalopatia espongiiforme bovina, coordenada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituído em 1966.

Este diagnóstico diferencial sempre se impõe como um desafio ao clínico e o apoio laboratorial criterioso é indispensável nestes casos. O diagnóstico *ante mortem* é difícil de ser realizado devido à ausência de sinais clínicos patognomônicos da maioria das doenças neurológicas. Por este motivo, o diagnóstico *post mortem* com auxílio de métodos laboratoriais se torna indispensável (HALFEN; VIDOR, 2001).

No Brasil, tem sido relatado aumento dos casos comprovados de meningoencefalite pelo herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), particularmente na região Sudeste, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Porém, a maioria dos casos de encefalite por BoHV-5 no Brasil não é diagnosticado ou é confundida com raiva, intoxicação por cloreto de sódio (NaCl) e botulismo (SPILKI et al., 2006).

Embora o BoHV-1 possa estar esporadicamente associado a casos de encefalite, o BoHV-5 é o principal responsável pela ocorrência de meningoencefalites fatais em bovinos (MEYER et al., 2001). Há relatos do isolamento do BoHV-5 em casos de aborto (ELY et al., 1996) e no sêmen (GOMES et al., 2003).

Os herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são vírus de DNA de fita dupla, com envelope glicoprotéico, que pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Comitê Internacional de taxonomia Viral). A principal propriedade biológica dessa subfamília é a capacidade de estabelecer latência em neurônios dos gânglios sensoriais após a infecção aguda (SILVA et al., 1998; ESTEVES, 2007).

Os principais sintomas observados na meningoencefalite herpética são nistagmo, bruxismo, opistótono, amaurose, sialorréia, andar em círculos, ataxia, tremores musculares e convulsões (SALVADOR et al., 1998; SANCHES et al., 2000; COLODEL et al., 2002; ELIAS; SCHILD; RIET CORREA, 2004; DIEL et al., 2005; ISERNHAGEN, 2005).

Com base nos comentários avaliados, estudos para a elucidação dos aspectos apontados se justificam por permitir melhor análise da presença do vírus, utilizando-se a técnica da PCR, do genoma do BoHV-5 em bovinos portadores ou não de encefalopatias. Esta informação é essencial para a avaliação da real incidência da meningoencefalite por BoHV-5 no rebanho brasileiro e para o correto diagnóstico das encefalopatias de bovinos. Através dessas informações, pode-se instituir com segurança o correto diagnóstico diferencial das encefalopatias em bovinos no Brasil, diminuindo a incidência de diagnósticos errôneos de meningoencefalite por BoHV-5 e permitindo que o país se enquadre nas condições sanitárias internacionais para a exportação qualquer produto de origem bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras biológicas

Para a realização da PCR deste estudo foram utilizadas amostras providas de três fontes:

1. Amostras de partes distintas do SNC oriundas do Hospital Veterinário da Universidade de Londrina de 17 animais com encefalopatias: 7 com diagnóstico de BoHV-5, 2 com diagnóstico de polioencefalomalácia, 2 com diagnóstico de encefalopatia hepática, 2 com diagnóstico de encefalite bacteriana, 1 com diagnóstico de intoxicação por clorpirifós, 1 com intoxicação por carbamato, 1 com diagnóstico de traumatismo craniano e 1 sem diagnóstico definitivo.

2. Amostras de córtex de 68 animais com encefalopatias oriundas do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília: 33 animais com diagnóstico confirmado de raiva, 8 com diagnóstico de botulismo, 7 com diagnóstico de

BoHV-5, 5 com diagnóstico de carbúnculo sintomático, 3 com diagnóstico de polioencefalomalácia, 2 com diagnóstico de diarreia viral bovina, 1 com diagnóstico de babesiose cerebral, 1 com diagnóstico de eimeriose nervosa, 2 com diagnóstico de encefalite bacteriana e 6 sem diagnóstico definido.

3. Amostras de partes distintas do SNC (pool de córtex, cerebelo e tronco encefálico) de 30 animais sadios de matadouro.

Após a morte natural, eutanásia (Hospitais Veterinários) ou abate (matadouro) dos animais, as cabeças foram removidas através de desarticulação atlantooccipital e amostras do sistema nervoso central (córtex, cerebelo e tronco encefálico) foram colhidas, exceto dos animais provindos do HV-UnB, de onde foram analisadas apenas amostras do córtex devido à falta de material armazenado das demais porções. As amostras foram separadamente acondicionadas em sacos plásticos identificados, congeladas a -20°C e destinadas às técnicas da PCR.

O material biológico (córtex) de animais com doenças neurológicas atendidos no HV-UnB foi colhido durante os anos de 2000 a 2005, enquanto o material provindo do HV-UEL foi colhido durante os anos de 2003 a 2009 e ambos encontravam-se congelados a -20°C . Os diagnósticos prévios destes animais foram estabelecidos pelos métodos clínicos e/ou clínicos e laboratoriais de acordo com a doença em questão.

Determinações laboratoriais

As amostras foram processadas no Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina para a pesquisa dos genomas do BoHV-1 e BoHV-5.

Extração do DNA

As amostras do sistema nervoso (500 μL) foram maceradas em meio de cultivo PBS (*phosphate buffer saline* = tampão salino-fosfato) pH 7.2, homogeneizadas e centrifugadas. Alíquotas de 500 μL do sobrenadante destes

macerados foram tratadas com tampão de lise, constituído por Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1% e 0,2 mg/mL de proteinase K (Glico BRL®). As amostras foram então homogeneizadas em vórtex por aproximadamente 15 segundos e mantidas em banho-maria a 56°C durante 30 minutos.

Para a extração do DNA viral, a metodologia utilizada foi uma associação das técnicas do fenol/clorofórmio/álcool isoamínico (THEIL et al., 1981) e da sílica/tiocinato de guanidina (BOOM et al., 1990) com modificações descritas por Alfieri et al. (2004). Esta associação otimiza a remoção de proteínas celulares contaminantes e outras macromoléculas além de intensificar a purificação das moléculas de DNA.

As amostras foram tratadas com 450 µL de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizadas em vórtex por 15 s e mantidas em banho-maria a 56°C durante 15 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g/10 min para coleta do sobrenadante. Em seguida, a fase aquosa foi processada em sílica / tiocinato de guanidina. Ao final, o DNA foi lavado em 50 µL de água ultra pura autoclavada, centrifugado a 10.000 x g por 2 min para recuperação do sobrenadante e mantido a -20°C até o momento do uso.

PCR

As amostras extraídas foram submetidas à técnica da PCR/*Nested-PCR* (NPCR) empregando-se primers que codificam a glicoproteína D. Os *primers* utilizados foram P3 *sense* (5'GCTGTGGGAAGCGGTACG3' nt.351-368), P4 *anti-sense* (5'GTCGACTATGGCCTTGTGTGC3' nt.817-796) e P5 *sense* (5'ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG3' nt.394-42), padronizados por Takiuchi et al., 2003.

Para a primeira reação foram empregados os *primers* P3 e P4, e para a segunda amplificação (*Semi-Nested-PCR*) foram utilizados os *primers* P4 (interno) e P5 (externo). A utilização destes primers resulta na amplificação de um segmento de 425pb tanto para o BoHV-1 quanto para o BoHV-5.

A desnaturação inicial do DNA foi realizada em uma solução contendo 5 µL de DNA extraído e 5 µL de DNA MIX [20 pmol de cada *primer* (P3/P4) e 3

μL de água ultra pura autoclavada] submetida a 94 °C por 7 min e imersa em gelo até a realização da próxima etapa, evitando com isso o fechamento das fitas de DNA. A primeira amplificação foi realizada através da adição à amostra de 40 μL de PCR-MIX constituído por 1,6 mM de dNTP (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 2.5 unidades de *Platinum Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 1X PCR buffer (20mM Tris–HCl pH 8.4; 50mM KCl); 1.5mM de MgCl_2 (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 8% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 21,8 μL de água ultra pura autoclavada, totalizando 50 μL por amostra.

As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-200, MJ Research Co., Water Town, MA, EUA) de acordo com as seguintes especificações: desnaturação inicial: 4 min a 94°C seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 min ; 60°C por 1 min; 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 7 min.

Para a realização da *Nested-PCR* (N-PCR), foram utilizados 8 μL do produto da primeira amplificação adicionados de 47 μL de NPCR MIX constituído pelas mesmas concentrações de reagentes utilizadas no primeiro ciclo de amplificação: dNTP, *Platinum Taq* DNA Polymerase, PCR buffer, MgCl_2 , e DMSO. Além disso, foram adicionados 20 pmol de cada *primer* (P4 e P5) e 26,8 μL de água ultra pura autoclavada, totalizando 55 μL por amostra. As reações foram realizadas em 30 ciclos com mesmas condições de tempo e temperatura da primeira amplificação.

Alíquotas de 10 μL dos produtos amplificados na NPCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2 %, com solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em solução de TEB pH 8,4 (tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM), sob voltagem constante (90V) por aproximadamente 40 min, visualizados em transluminador ultravioleta (UV) e fotodocumentado em sistema digital (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 290*, KODAK®, New York, EUA).

PCR diferencial BoHV-1 e BoHV-5 (Multiplex-PCR)

As amostras positivas na NPCR foram submetidas a novo processo para diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 (M-PCR). Para isso foram utilizadas as amostras de DNA extraídas anteriormente dos macerados de SNC. Estas foram submetidas à técnica da PCR de acordo com o descrito por Claus (2002), empregando-se oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência do gene que codifica a glicoproteína C: B5, específico para o BoHV-5 (5'CGG ACG AGA AGC CCT TGG 3' - nt 322-339); B1, específico para o BoVH-1 (5'CAA CCG AGA CGC AAA GCT 3' – nt 185-204) e Bcon, *primer* consenso [5'AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG 3'-nt 461-480 (BoHV-5) e nt 519-538]. A utilização destes primers resulta na amplificação de um segmento de 354pb para o BoHV-1 e 159pb para o BoHV-5.

Nesta etapa, foram utilizados 5 µL de DNA extraído e 5 µL de DNA MIX [20 pmol de cada *primer* (B5 e Bcon para BoHV-5 e B1 e Bcon para BoHV-1) e 3 µL de água ultra pura autoclavada) sujeitos a 94 °C por 7 min para desnaturação e imersa em gelo até a realização da próxima etapa, evitando com isso o fechamento das fitas de DNA. Para a amplificação utilizou-se 40 µL do PCR-MIX descrito anteriormente, sendo realizada em termociclador com as seguintes especificações: desnaturação inicial 4 min a 94°C seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 min ; 60°C por 1 min; 72°C por 1 min e extensão final a 72 °C por 7 min.

As amostras foram primeiramente analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2 %, e os resultados positivos foram confirmados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% corado com nitrato de prata.

RESULTADOS

No presente estudo nenhuma amostra apresentou resultado positivo para o herpesvírus bovino 1.

Universidade de Brasília

Foram examinadas 68 amostras de SNC de animais com doença neurológica, das quais 33 pertenciam a animais raivosos confirmados. Do total de amostras, 21 (30,88%) apresentaram resultado positivo para presença do genoma do BoHV-5, dos quais 3 casos foram de amostras de animais sem diagnóstico conclusivo, 7 casos de animais com diagnóstico confirmado de raiva, 7 casos com infecção por BoHV-5, 1 caso de animal com polioencefalomalácia, 1 caso de animal com botulismo, 1 caso de animal com encefalite bacteriana e 1 caso de animal com carbúnculo sintomático (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1: Resultados das M-PCR para detecção do DNA do BoHV-5 das amostras da Universidade de Brasília.

Material Analisado	Número de amostras (animais)	Quadro clínico diagnosticado como:	Total resultado positivo para BoHV-5
Córtex	6	Inconclusivo	3 (50%)
Córtex	7	BoHV-5	7 (100%)
Córtex	8	Botulismo	1 (12,5%)
Córtex	2	Encefalite	1 (50%)
Córtex	3	Polioencefalomalácia	1 (33,3%)
Córtex	5	Carbúnculo sintomático	1 (20%)
Córtex	33	Raiva	7 (21,2%)
Córtex	2	Diarréia Viral Bovina	0
Córtex	1	Babesiose cerebral	0
Córtex	1	Eimeriose nervosa	0



Figura 1: Resultado da M-PCR para a detecção do DNA do BoHV-5 em gel de agarose a 2% de amostras da Universidade de Brasília. **Canaleta 1:** Controle positivo BoHV-5 com 159pb – estirpe AA01, **Canaletas 2 a 6; 8 e 11:** Amostras positivas córtex, **Canaletas 7 e 9:** Amostras negativas córtex, **Canaleta 10:** Água ultra-pura autoclavada (controle negativo).

Universidade Estadual de Londrina

Das amostras examinadas, apenas duas (2/17 animais – 11,76%) apresentaram resultado positivo para a presença do genoma de BoHV-5, sendo estas amostras provindas de animais com diagnóstico prévio de BoHV-5 (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 2: Resultados das M-PCR para a detecção do DNA do BoHV-5 para detecção do DNA de BoHV-5 das amostras da Universidade Estadual de Londrina.

Material Analisado	Número de amostras (Animais)	Quadro clínico diagnosticado como:	Total resultado positivo para BoHV-5
Pool córtex			0
Cerebelo	7	BoHV-5	1 (14,28%)
Tronco encefálico			1 (14,28%)
Pool córtex			0
Cerebelo	1	Intoxicação carbamato	0
Tronco encefálico			0
Pool córtex			0
Cerebelo	1	Trauma cranial	0
Tronco encefálico			0
Pool córtex			0
Cerebelo	1	Inconclusivo	0
Tronco encefálico			0
Pool córtex			0
Cerebelo	1	Intoxicação clorpirifós	0
Tronco encefálico			0
Pool córtex			0
Cerebelo	2	Encefalopatia hepática	0
Tronco encefálico			0
Pool córtex			0
Cerebelo	2	Polioencefalomalácia	0
Tronco encefálico			0
Pool córtex			0
Cerebelo	2	Encefalite bacteriana	0
Tronco encefálico			0



Figura 2: Resultado da M-PCR para a detecção do DNA do BoHV-5 em gel de agarose a 2% das amostras da Universidade Estadual de Londrina. **Canaleta 1:** Controle positivo BoHV-5 com 159pb – estirpe AA01, **Canaleta 2:** Amostra positiva cerebelo, **Canaleta 3:** Amostra positiva tronco encefálico, **Canaleta 4:** Amostra negativa, **Canaleta 5:** Água ultra-pura autoclavada (controle negativo).

Matadouro

Das 30 amostras avaliadas, 2 (7%) apresentaram resultado positivo para presença do genoma de BoHV-5 (Tabela 3) (Figura 3).

Tabela 3: Resultados das M-PCR para detecção do DNA do BoHV-5 das amostras do matadouro.

Material analisado	Total de amostras (animais)	Total resultado positivo para BoHV-5
Tronco encefálico		2 (7%)
Córtex	30	0
Cerebelo		0

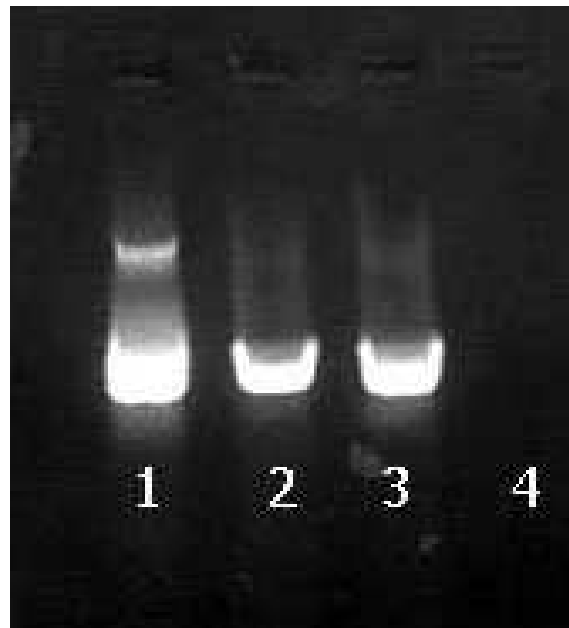


Figura 3: Resultado da M-PCR para a detecção do DNA do BoHV-5 em gel de agarose a 2% das amostras do matadouro. **Canaleta 1:** Controle positivo BoHV-5 com 159 pb – estirpe AA01, **Canaletas 2 e 3:** Amostras positivas tronco encefálico, **Canaleta 4:** Água ultra-pura autoclavada.

DISCUSSÃO

Contradizendo autores que afirmam que o herpesvírus bovino tipo 1 é principalmente atribuído a problemas respiratórios e reprodutivo e raramente à encefalite, Silva et al. (2007), encontraram genoma de BoHV-1 em 19,3% (5 em 26 casos) dos encéfalos de bovinos com doenças neurológicas. Esses achados indicam a necessidade de se considerar sempre o BoHV-1 como suspeito em casos de doença neurológica, embora o BoHV-5 seja o mais frequentemente envolvido. A ausência de resultados positivos nesse estudo para o genoma do BoHV-1 contradiz esses dados, mas a abrangência deste estudo foi pequena em comparação com o estudo realizado por Silva et AL. (2007). Estudos anteriores demonstraram que a infecção por BoHV-1 com a sintomatologia clássica (respiratória e reprodutiva) encontra-se difundida em todo o Brasil, o que faz com que mais pesquisas desse agente no SNC sejam necessárias.

Em relação à técnica utilizada essa se mostrou de grande eficiência para a identificação do genoma do BoHV-5 em amostras do SNC, inclusive em amostras armazenadas por um período superior a 5 anos. Nesse estudo, a possibilidade de contaminação de amostras durante as etapas de extração foi eliminada pela não contaminação dos controles negativos.

A utilização de 8% de DMSO e a concentração de 1,5mM de MgCl₂ foram descritas por Takiuchi et al. (2003), que afirmaram que o efeito benéfico do DMSO na reação pode ser explicado pela alta quantidade de ligações G-C na região alvo selecionada, e que o reagente promove desestabilização da fita dupla de DNA, facilitando o anelamento dos *primers*. Afirmaram também que, se for utilizada concentração superior à 1,5mM de MgCl₂ são produzidos rastros que prejudicam a visualização das bandas na leitura do gel.

Várias técnicas de PCR vêm sendo desenvolvidas para a detecção de BoHV-5 em tecidos frescos (recém colhidos), porém, estudos para desenvolvimento de técnicas de PCR para a detecção de BoHV-5 em tecidos fixados e parafinados ainda são poucos, o que impede o processamento de material estocado de animais nos casos em que não houve um diagnóstico definitivo, ou mesmo para levantamentos epidemiológicos sobre a doença

(FERRARI et al, 2007). No entanto, a grande quantidade de resultados positivos encontrada nas amostras de Brasília demonstra que, mesmo em material mantido congelado por longos períodos, é possível a detecção do DNA viral, podendo, nesses casos, ser realizado levantamento epidemiológico.

As amostras positivas provindas dos animais de matadouro foram da mesma região anatômica nos dois animais: o tronco encefálico. Todas as amostras positivas provindas do Hospital Veterinário de Brasília foram de córtex, e as amostras do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina apresentaram resultado positivo tanto em cerebelo quanto em tronco encefálico, o que condiz com Isernhagen (2005) e Vogel et al. (2003) que afirmaram não haver região distinta para a presença do genoma viral no SNC. Vale ressaltar que o número de amostras positivas poderia ser maior se houvesse outras regiões para análise que não o córtex, uma vez que o vírus não se distribui uniformemente no SNC.

Segundo Caron et al. (2002), diferenças nas rotas neuronais usadas pelo vírus para acessar o SNC durante a reativação e infecção aguda pode contribuir para as diferentes distribuições no SNC. Em coelhos, após a inoculação, a rota olfatória parece ser a mais provável via de migração do vírus ao SNC na infecção aguda; após a inoculação subconjuntival do BoHV-1 em coelhos, a infecção latente foi mais encontrada no gânglio trigêmeo.

Os resultados encontrados nos animais do matadouro demonstram que mesmo animais saudáveis podem ser portadores do herpesvírus bovino 5, e confirmam as afirmações de que as infecções latentes geralmente não são seguidas do surgimento de sintomatologia clínica, o que faz com que os próprios animais sejam responsáveis pela manutenção da doença no rebanho.

Os resultados encontrados nos animais provenientes do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (30,88% de amostras positivas) são compatíveis com Riet-Correa et al. (2006), que afirmaram que a meningoencefalite herpética e mesmo a infecção latente pelo BoHV-5 em bovinos do Brasil deve ser maior que a relatada na literatura. Nessas amostras em particular, pôde-se demonstrar que mesmo amostras armazenadas há cerca de 5 anos são aptas a serem processadas. Estes dados confirmam as afirmações de Spilki et al. (2003) que afirmaram que quando o vírus da raiva é identificado no encéfalo de animais com sinais neurológicos e devido à

natureza da doença e da fatalidade da mesma, geralmente não há busca rotineira por outros agentes que poderiam estar causando a enfermidade.

Nesse estudo demonstrou-se a infecção latente de BoHV-5 associada a outras doenças do SNC. O principal achado foi o grande número de resultados positivos em animais confirmadamente positivos para raiva. Spilki et al. (2003) já haviam relatado infecção mista do BoHV-5 e do vírus rábico em um único bezerro que morreu raivoso, porém afirmaram não ter sido possível determinar se o BoHV-5 teve algum papel ativo no desfecho da enfermidade, uma vez que o vírus poderia estar presente em forma latente nos tecidos neurais. Talvez, além do estresse causado pela encefalite, lesões provocadas pelo vírus rábico possam ser desencadeadores da multiplicação BoHV-5 no tecido nervoso, o mesmo acontecendo com outras encefalopatias ou doenças, à exceção da polioencefalomalácia que poderia ser a infecção pelo BoHV-5 uma das causas segundo Riet et al. (2006).

O presente estudo é o primeiro a utilizar amostras de um grande número de animais com diagnóstico positivo para raiva, o que demonstra a grande importância do correto diagnóstico das doenças neurológicas, pois a omissão de alguns diagnósticos diferenciais pode mascarar o agente que realmente está causando a enfermidade no animal, colocando em risco a integridade física das pessoas envolvidas no diagnóstico dos animais ou mesmo dos outros animais do rebanho.

Ilustrando esta importância do correto diagnóstico diferencial, Spilki et al. (2006) descreveram infecção concomitante de BoHV-5 com o vírus da diarreia viral bovina (VDVB). Sugeriram que um evento imunossupressivo possa ser necessário para a indução da meningoencefalite por BoHV-5 em bezerros e, como o VDVB é um agente com capacidade imunossupressora, é esperado que se encontrem bovinos com infecção mista de BoHV-5 e VDVB em condições de campo.

Riet-Correa et al. (2006) sugeriram ter encontrado encefalite por BoHV-5 secundárias à polioencefalomalácia. Afirmaram que é provável que a meningoencefalite por BoHV-5 seja mais frequente que o relatado e que é possível que muitos surtos não sejam diagnosticados, especialmente em se tratando de casos isolados, em condições extensivas de criação. Além disso,

defenderam que a necessidade do correto diagnóstico diferencial das doenças neurológicas, principalmente da encefalite por BoHV-5, se deve à importância do diagnóstico diferencial com raiva e outras doenças que cursam com sintomatologia nervosa semelhante, sendo necessário manter uma rotina de diagnóstico que permita determinar as enfermidades que afetam o sistema nervoso de bovinos.

Além disso, esse estudo demonstrou a alta frequência do vírus latente da meningoencefalite herpética na região de Brasília e entorno, o que faz com que mais pesquisas para a verificação da real incidência da enfermidade na região devam ser feitas. Também ilustrou a diferença da distribuição do BoHV-5 pelo Brasil.

CONCLUSÕES

A técnica da PCR tem grande importância no diagnóstico diferencial de doenças que acometem o Sistema Nervoso Central de bovinos, devendo os resultados da mesma ser analisados com cautela, pois, como demonstrado a presença do DNA viral em amostras de SNC não indica que aquele agente esteja causando a enfermidade no animal, demonstrando que a presença do genoma do BoHV-5 no SNC de bovinos não indica, necessariamente, infecção aguda pelo vírus.

Esses resultados demonstram a importância da associação das técnicas de isolamento viral juntamente com a PCR para o correto diagnóstico da meningoencefalite herpética, uma vez que a cultura e isolamento viral, por necessitar da viabilidade da partícula viral, podem apresentar resultado falso-negativo, enquanto a PCR, por detectar o genoma viral e não a atividade do mesmo, pode apresentar resultado falso-positivo. O uso da PCR no diagnóstico de meningoencefalite por herpesvirus bovino 5 deve ser feito concomitantemente com histopatologia e, se possível com imuno-histoquímica.

A presença do genoma do BoHV-5 em amostras de animais confirmadamente positivos para raiva demonstra a importância da análise cuidadosa de resultados positivos na PCR para BoHV-5, uma vez que quando mal interpretados, estes resultados podem negligenciar o diagnóstico para outras doenças neurológicas importantes e com alto potencial zoonótico, como é o caso da raiva.

A prevalência da presença do genoma do BoHV-5 em rebanhos brasileiros pode ser maior que o relatado na literatura, além de haver significativas diferenças regionais de disseminação tanto de BoHV-1 quanto de BoHV-5, o que torna necessário mais estudos para elucidação deste questionamento.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHAIN, L.J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1998. **Veterinary Microbiology**, n.99, p. 167-173, 2004.

ANDRADE, G.I., Diagnóstico sorológico de *Herpesvírus bovino 1 e 5*: Proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície. 2005. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-Van, P.M.E.; NOORDAA, J.V. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, n.3, p. 495-503, 1990.

CLAUS, M.P. Detecção do herpesvírus bovino tipos 1 e 5 por amplificação parcial do gene da glicoproteína C e estudo retrospectivo da meningoencefalite herpética bovina. 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

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

ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.3, p.123-131, 2004.

ELY, R.W.; D'OFFAY, J.M.; RUEFER, A.H. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.**, v.8, p.487- 492, 1996.

ESTEVES, P.A. Análise da região carboxi-terminal da glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5). 2007. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAMAL, P.; CARDOSO, T.C. Detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin –embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue based diagnostic test of bovine encephalitis. **Journal of Virological Methods**, v.146, n. 1-2 p. 335-340, 2007.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A; BARBOSA-STANCIOOLI, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**. v. 27, p. 495-504, 2003

HALFEN, D.C.; VIDOR, T. Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS,

R.A.A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2001. v.2, p. 97-108.

ISERNHAGEN, A.J. Meningoencefalite herpética em bezerros: evolução clínica e diagnóstico. 2005. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, n.4, p.633-652, 2001.

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

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

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

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

SILVA, M. S., BRUM, M.C., WEIBLEN, R., FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas

no Centro Centro--Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p. 403-408, 2007.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIRA, R.S.; VICENTINI, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-2) e 5 (BVH-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.1, p.13-18, 2002.

SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R.A.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvírus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.1, p.1-4, 2003.

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

THEIL, K.W.; McCLOSKEY, C.M.; SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; BOHL, E.H.; HANCOCK, D.D.; KOHLER, E.M.; MOORHEAD, P.D. Rapid, Simple Method of Preparing Rotaviral Double-Stranded Ribonucleic Acid for Analysis by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, v.14, n.6, p. 273-280, 1981.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of bovine herpesvírus type 5 in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.10, p. 4512-4520, 2003.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência da meningoencefalite herpética no Brasil ainda não está esclarecida, porém há relatos da presença do BoHV-5 em diversos estados brasileiros.

Pela ausência de sintomatologia clínica patognomônica, o BoHV-5 deve sempre ser considerado no diagnóstico diferencial das doenças que afetam o sistema nervoso central de bovinos. Devido à característica do BoHV-5 de estabelecer infecção latente, o clínico deve sempre associar técnicas diagnósticas, uma vez que este agente pode ser encontrado em amostras biológicas de animais que apresentam outra enfermidade que esteja causando os sintomas nesses animais, como é o caso dos animais positivos para raiva utilizados nesse estudo.

Mais pesquisas sobre a ação do herpesvírus bovino 5 em animais encefalopatas são necessárias para esclarecer se realmente a presença de lesões prévias no sistema nervoso central desses animais é um fator desencadeante para a multiplicação viral.

Há necessidade também de mais pesquisas sobre a presença do herpesvírus bovino 1 no SNC de Bovinos, uma vez que estudos deste tipo ainda são escassos e os achados, até o momento, contradizem a literatura clássica que afirma que o BoHV-1 causa apenas esporadicamente encefalite em bovinos, podendo incluir esse agente na lista de diagnóstico diferencial de doenças neurológicas de bovinos.

ANEXOS

Anexo I: Soluções e Tampões**Tampão Fosfato Salina (PBS)**

- Cloreto de Sódio P.A. (NaCl) 8,0 g (137 mM)
- Cloreto de Potássio P.A. (KCl) 0,2 g (3mM)
- Sódio fosfato dibásico anidro P.A. (Na₂HPO₄) 1,2 g (8mM)
- Potássio fosfato monobásico P.A. (KH₂PO₄) 0,2 g (15mM)

SDS 10%

- Dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) 5 g
- Água bidestilada q.s.p. 50 mL

Proteinase K

- Proteinase K (Fungal) 100mg
- Água miliQ q.s.p. 5 mL

Fenol/Clorofórmio – Álcool Isoamílico (25:24:1)

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

Solução L6

- 120 g de tiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCL 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton x 100

Hidratação da sílica

- 60 g de sílica (SiO₂)
- 500 mL de água MiliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
- Desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500mL de água bidestilada
- Repouso por 5 horas até sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600µL de HCL (32% p/v) para ajustar pH = 2,0
- Aliquotar e autoclavar

Solução L2

- 120 g de tiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCL 0,1 M pH 6,4

Álcool Etílico 70%

- Álcool etílico hidratado 92,8° INPM – 95° GL (C₂H₂OH) 35,71 mL
- Água miliQ q.s.p. 100 mL

Tampão de Fenol

- Hidroximetil amino metano – TRIS 2,5 g
- Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) 11,5 g
- Ácido etilenodiaminotetraacético SAL DI-SÓDICO – EDTA P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂2H₂O) 0,75 g
- Água bidestilada q.s.p. 2000 mL

Fenol Saturado

- Fenol destilado 500 mL
- Tampão de fenol 500 mL
- Homogenizar, deixar descansar e retirar sobrenadante até pH 7,4 - 8

Ágar

- Ágar Noble 2 g
- 100 mL água destilada q.s.p.

Tampão de amostra para Agarose

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose P.A. – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%

Tampão de corrida para agarose: TBE (TRIS – Ácido Bórico - EDTA) 1x []

- Hidroximetil amino metano – TRIS 10,778 g (89mM)
- Ácido bórico (H_3BO_3) 5,503 g (89mM)
- Ácido etilenodiaminotetraacético SAL DI-SÓDICO – EDTA P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) 0,747 g (2mM)
- Água bidestilada q.s.p. 1000mL
- pH ,8,4

Acrilamida

- N N'- Methylene – bis – Acrylamide 1,3 g
- Acrilamida 50 g
- Água bidestilada q.s.p 100 mL

Lower Tris

- Hidroximetil amino metano – TRIS 36,34 g
- Água bidestilada 200 mL
- Ácido clorídrico (HCl) para ajustar pH 8,8

Upper Tris

- Hidroximetil amino metano – TRIS 12,12 g
- Água bidestilada 200 mL
- Ácido clorídrico (HCl) para ajustar pH 6,8

Persulfato de amônio P.A 0,2%

- Persulfato de amônia P.A. ($(NH_4)_2S_2O_8$) 0,04 g
- Água bidestilada 2 mL

Tampão de amostras para Acrilamida

- Azul de bromofenol (0,05%) 0,4 mL
- SDS 10% 2,0 mL
- 2 – Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) 0,2 mL
- Hidroximetil amino metano – TRIS – HCl 0,5M 2,0 mL – pH 6,8
- Glicerol 2,0 mL
- Água bidestilada 4,7 mL

Tampão de corrida para Acrilamida

- Hidroximetil amino metano – TRIS 3 g
- Glicina P.A. 14.4 g
- Água bidestilada q.s.p 1000 mL

Solução de Coloração

- Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) 9 g
- Formoldeído (CH₂O) 2,5 mL
- Água bidestilada q.s.p 300 mL
- Sodium borohydride 0,06 g

Solução de Prata

- Nitrato de prata P.A. (AgNO₃) 0,55 g
- Água bidestilada q.s.p 300 mL

Solução Stop

- Ácido acético glacial P.A. (CH₃COOH) 15 mL
- Água bidestilada q.s.p 300 mL

Solução Fixadora

- Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) 30 mL
- Ácido acético glacial P.A. (CH₃COOH) 1,5 mL
- Água bidestilada q.s.p 300 mL

Solução de Conservação

- Álcool etílico absoluto (C_2H_2OH) 30 mL
- Água bidestilada q.s.p 300 mL

Anexo II: Lista de Reagentes

- 10X PCR Buffer (Gibco BRL®)
- 123 bp DNA Ladder (Gibco BRL®)
- 2 – Mercapto-ethanol ($C_2H_6O_5$) P.M. 78,13 (Fluka®)
- Acetona P.A (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
- Ácido acético glacial P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
- Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab®)
- Ácido clorídrico (HCl) P.M (Reagen®)
- Ácido etilenodiaminotetraacético SAL DI-SÓDICO – EDTA P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen®)
- Acrilamida (C_3H_5NO) P.M. 71,08 (Vetec®)
- Ágar Noble (Difco®)
- Álcool etílico absoluto (C_2H_2OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
- Álcool etílico hidratado 92,8° INPM – 95° GL (C_2H_2OH) (Da Ilha®)
- Álcool isoamílico
- Azul de bromofenol (Sigma®)
- Cloreto de potássio P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
- Cloreto de sódio P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
- Clorofórmio P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica®)

- Dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (BDH®)
- Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}N_3Br$) P.M. 394,3 (Sigma®)
- Fenol saturado
- Formoldeído (CH_2O) P.M. 30,03 (Biotec®)
- Glicerol
- Glicina P.A. (Nuclear®)
- Guanidine isothicyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
- Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
- Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$) (Gibco BRL®)
- N N'- Methylene – bis – Acrylamide (Sigma®)
- Nitrato de Prata P.A. ($AgNO_3$) (Symylar®)
- Persulfato de amônia P.A. ($(NH_4)_2S_2O_8$) P.M. 288,2 (Sigma®)
- Potássio fosfato monobásico P.A. (KH_2PO_4) P.M. 136,09 (Labsynth®)
- Proteinase K (Fungal) (Gibco BRL®)
- Sacarose P.A. – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) P.M. 342,31 (Reagen®)
- Silicon dioxide (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma®)
- Sódio fosfato dibásico anidro P.A. (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth®)
- Sodium borohydride P.M 37,83 (Sigma®)
- *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL®)
- TEMED P.M 116,21 (Gibco BRL®)
- Triton x 100 (Cirq®)

Anexo III: Protocolo de extração do DNA

[Associação das técnicas do fenol/clorofórmio/álcool isoamínico (THEIL et al., 1981) e da sílica/tiocinato de guanidina (BOOM et al., 1990) com modificações descritas por Alfieri et al. (2004)]

1. 500 µL da amostra em um eppendorf grande
2. Adicionar 50 µL SDS
3. Adicionar 12 µL proteinase K
4. Vórtex por 10 segundos
5. 30 minutos em banho-maria a 56°C
6. Vórtex por 10 segundos
7. Adicionar 450 µL de fenol clorofórmio isoamínico
8. Vórtex por 10 segundos
9. 15 minutos em banho-maria a 56°C
10. Centrifugar por 10 minutos em alta rotação (10.000xg)
11. Recolher a fase aquosa/sobrenadante (450µL) em outro eppendorf
12. Acrescentar 1000 µL de solução L6
13. Acrescentar 25 µL de sílica
14. Vórtex por 10 segundos
15. Deixar em agitador por 30 minutos à temperatura ambiente
16. Centrifugar por 30 segundos em alta rotação (10.000xg)
17. Desprezar o sobrenadante por inversão em solução de NaOH 10M
18. Adicionar 500 µL de solução L2
19. Vórtex por 10 segundos
20. Centrifugar por 30 segundos em alta rotação (10.000xg)
21. Desprezar o sobrenadante por inversão em solução de NaOH 10M
22. Repetir os passos 18,19, 20 e 21
23. Acrescentar 1000 µL de etanol 70%
24. Vórtex por 10 segundos

25. Centrifugar por 30 segundos em alta rotação (10.000xg)
26. Desprezar o sobrenadante por inversão em solução de NaOH 10M
27. Repetir os passos 23,24, 25 e 26
28. Adicionar 1000 μ L de acetona P.A
29. Vórtex por 10 segundos
30. Centrifugar por 30 segundos em alta rotação (10.000xg)
31. Desprezar o sobrenadante por inversão em solução de NaOH 10M
32. Secar o pellet de sílica com eppendorf aberto em estufa
33. Adicionar 50 μ L de água miliQ autoclavada
34. Vórtex por 10 segundos
35. 15 minutos em banho-maria a 56°C
36. Vórtex por 10 segundos
37. Centrifugar por 2 minutos em alta rotação (10.000xg)
38. Recolher sobrenadante em eppendorf pequeno estéril
39. Estocar a -20°C.

