



**Vigilância epidemiológica de doenças do sistema nervoso central em bovinos: diagnóstico do herpesvírus bovino.**

**Marcia Mayumi Fusuma**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.  
Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

**São Paulo**

**2014**



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS  
AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**  
**Pós-Graduação**

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252  
CEP 04014-002 - São Paulo – SP  
secretariapg@biologico.sp.gov.br



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Nome do candidato:** MARCIA MAYUMI FUSUMA

**Título:** Vigilância epidemiológica de doenças do sistema nervoso central em bovinos: diagnóstico do herpesvírus bovino.

**Orientadora:** Edviges Maristela Pituco

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof.a Dra.: Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. Dr.: Enio Mori

Instituição: Instituto Pasteur

Assinatura:

Prof. Dr.: Fábio Gregori

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, cunhados, parentes e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram na realização e conclusão de mais uma etapa em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Maristela Pituco, por me aceitar como orientada e pela confiança, por todo o incentivo em cada etapa deste trabalho, pela orientação, carinho, reconhecimento e apoio em todos os momentos.

À minha querida mãe pelo apoio e pela paciência em ouvir meus desabafos nos momentos difíceis.

Ao meu pai e aos irmãos por sempre me ajudarem na minha formação, ao cunhado e cunhadas; tios e primos que de certa forma também contribuíram nesta etapa.

Às pesquisadoras Dra. Eliana, Liria e Claudia Del Fava pela paciência e pelo auxílio na minha formação.

Aos amigos, colegas e estagiários do Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB) que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, muito obrigada Claudia Ribeiro, Martinha, Ana, Raquel, Washington, Tereza, Adriana, Simone, Maira, Letícia, Thais, Michele, Aida, Tais, Alisete, Vivian, Michelinha, Elisângela, Luis, Natália, Daniel.

Aos amigos de infância, cursinho e faculdade (em especial à Akemi, Juliana, Karen e Patty) que mesmo sem muito tempo nesta fase difícil, ainda permaneceram ao meu lado apoiando e transmitindo palavras confortáveis e de incentivo.

Aos colegas e amigos que conquistei no decorrer dos anos e ajudaram com muitas experiências profissionais contribuindo assim para a execução deste trabalho; com muito carinho, agradeço ao Pedro Jeovah, Simone Miyashiro, Ricardo Harakava, Leonardo Mesquita. Em especial, agradeço a vocês que me auxiliaram profissionalmente e nos momentos difíceis me ajudaram chamando para momentos descontraídos Gabi, Roberta, Carol, Geisly, Gaya, Gi, Alberto, Fernanda, Dú, Elaine, Priscila, Lú, Sabrina, Raquel, Eli, Clóvis, Lucila e Lívia.

Aos colegas da pós-graduação e em especial à Kellynha, Mari e Nara que sempre estiveram ao meu lado desde a época de Pibic.

À equipe do Laboratório de Anatomia Patológica, Dras. Cristina Corsi Dib, Dirlene Marques Justino e Bianca Grimbergs de Azevedo Carneiro pelo processamento histopatológico das amostras.

Aos membros da banca Dr. Fábio Gregori e Dr. Enio Mori pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Aos professores da pós-graduação e em especial à Dra. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar e Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro, por aceitarem prontamente ao pedido e pelas contribuições como membro suplente.

Ao Instituto Biológico e ao LVB por ser essa casa acolhedora e prazerosa e que vem incentivando e contribuindo na construção do conhecimento de inúmeros profissionais.

Muito obrigada a todos que lutaram junto comigo e torceram por mais esta vitória!

## EPÍGRAFE

“Quando temos um grande sonho, nenhum obstáculo é grande demais para ser superado.”

**Augusto Cury.**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

**José Martiniano de Alencar.**

## RESUMO

FUSUMA, M. M. - VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM BOVINOS: DIAGNÓSTICO DO HERPESVÍRUS BOVINO. São Paulo. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

As encefalites são lesões inflamatórias do Sistema Nervoso Central (SNC) que podem ser causadas por diversos agentes, priônicos, virais, bacterianos, parasitários e por outros não infecciosos. Considerando que o Brasil situa-se entre os maiores exportadores de carne bovina, necessita fortalecer o sistema de vigilância epidemiológica das doenças do SNC, realizando o diagnóstico diferencial das encefalites e encefalopatias a fim de fornecer informações epidemiológicas para o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias (PNCRH). Dentre os agentes a serem incluídos, destaca-se os herpesvírus bovino 1 e 5 (BoHV-1 e 5), tendo em vista que o BoHV-5 é o agente causador da meningoencefalite herpética bovina e por ser uma doença frequentemente descrita no Brasil. Objetivou-se 1) padronizar a PCR em tempo real quantitativa *multiplex* (qPCR *multiplex*) para o BoHV-1 e 5, 2) avaliar a sensibilidade analítica, 3) diagnosticar a ocorrência do BoHV-1 e 5 em amostras clínicas de SNC e 4) comparar os resultados obtidos com a *nested* PCR convencional. A curva padrão da qPCR *multiplex* foi construída a partir do produto de PCR purificado. Amplificou-se a região do gene da UL30, utilizando sondas marcadas com fluoróforos FAM e VIC, respectivamente para o BoHV-1 e 5. Utilizou-se como controle positivo para o BoHV-1 a cepa de referência Los Angeles, e para o BoHV-5 uma amostra isolada e caracterizada pelo Laboratório de Viroses de Bovídeos. Foram analisadas 268 amostras clínicas de SNC, correspondentes ao período de janeiro de 2012 a janeiro de 2014, com diagnóstico negativo para a raiva na imunofluorescência direta e prova biológica. Selecionou-se diversas regiões do SNC de cada amostra e o DNA total foi extraído pelo método de TRIzol<sup>®</sup>, a qualidade do DNA extraído foi avaliada pela reação de PCR em tempo real para a região do gene 16SrRNA do DNA mitocondrial. As amostras foram submetidas à técnica de *nested* PCR convencional

em ensaios separados para BoHV-1 e 5. A repetibilidade e reprodutibilidade foi demonstrada avaliando-se a curva padrão em triplicata e em cinco ensaios diferentes. A sensibilidade analítica da qPCR *multiplex* foi  $10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ L para o BoHV-1 e 5. Detectou-se 3,35% (9/268) de animais positivos ao BoHV-5 e nenhuma amostra positiva ao BoHV-1, ainda que o controle positivo padrão tenha funcionado adequadamente. Observou-se concordância entre os resultados obtidos nas duas técnicas. A quantificação da carga viral nas amostras clínicas variou com concentrações de  $10^1$  a  $10^4$  cópias de DNA/ $\mu$ L. Obteve-se sucesso na padronização da qPCR *multiplex* que demonstrou ser tão sensível quanto a *nested* PCR, e a vantagem sobre a *nested* PCR por ser uma técnica rápida e com menor risco de contaminação. A ocorrência do BoHV-5 foi maior em animais na faixa etária de 12 a 24 meses de idade, corroborando com outros autores. A rapidez da qPCR *multiplex* no diagnóstico do BoHV-5 permite a confirmação molecular da presença deste agente em tempo oportuno, destacando-se a importância da análise conjunta de dados clínico-epidemiológicos, achados histopatológicos e isolamento viral do agente causal, a fim de realizar o diagnóstico diferencial e contribuir com o sistema de vigilância de síndrome neurológica.

**Palavras-chave:** encefalites, diagnóstico diferencial de doenças do sistema nervoso central, BoHV-1, BoHV-5, *nested* PCR, PCR em tempo real *multiplex*.

## ABSTRACT

FUSUMA, M. M. – EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF BOVINE CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES: DIAGNOSIS BOVINE HERPESVIRUS. São Paulo. 2014. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

The encephalitis are inflammatory lesions of central nervous system (CNS) caused by several agents such as prions, virus, bacteria, parasites and non infectious agents. Considering that Brazil is the largest exporter of beef needs to efforts the epidemiological surveillance of CNS diseases, performing the differential diagnosis of encephalitis and encephalopathies in order to give the epidemiological dates to National Programm of Rabies of Herbivores and other Encephalopathies (PNCRH). Among infectious diseases, the Bovine herpesvirus types 1 and 5 (BoHV-1 and 5) must be included, mainly BoHV-5 responsible by bovine herpetic meningoencephalitis and often described in Brazil. The aims of this study were: 1) to standardization a multiplex quantitative realtime PCR (qPCR multiplex) for BoHV-1 and 5, 2) to evaluate the analytical sensitivity, 3) to detect the occurrence of BoHV-1 and 5 in bovine CNS clinical samples and 4) to compare the results with nested PCR. The standard curve to qPCR multiplex was performed from the purified PCR product. The region of UL30 gene was amplified using fluorogenic probes FAM and VIC that identify, respectively, BoHV-1 and 5. The Los Angeles strain was used as positive control of BoHV-1 and to BoHV-5, one isolate characterized by Laboratório de Viroses de Bovideos. Two hundred and sixty eight CNS samples from January 2012 to January 2014, negative for rabies in IFAT and *in vivo* isolation were analyzed to present study. Various regions of CNS of each sample were selected and genomic DNA was extracted by TRIzol<sup>®</sup> method. The quality of extracted DNA was evaluated by realtime PCR using set of primers that code the 16SrRNA of mitochondrial DNA gene. The samples were submitted to nested PCR to BoHV-1 and 5, in separate assays. The repeatability and reproducibility were demonstrated by evaluating the standard curve in triplicate and in 5 different assays. The analytical sensitivity of qPCR multiplex was

10<sup>1</sup> copies of DNA/μL to BoHV-1 e 5. It was detected 3.35% (9/268) of positive animals to BoHV-5 and none for BoHV-1, the controls functioned as expected. It was observed agreement between the results of two methods. The viral quantification of clinical samples various 10<sup>1</sup> a 10<sup>4</sup> copies of DNA/μL. The standardization of qPCR multiplex showed to be sensitive as nested PCR and an advantage to be fast and low risk of contamination. The most frequency of occurrence of BoHV-5 was observed in animals aged from 12 to 24 months, as reported by other authors. The qPCR multiplex in the diagnosis of BoHV-5 allows the molecular confirmation of the presence of this agent in a timely, showing the importance of joint analysis of clinical and epidemiological data, histopathology and virus isolation of the causative agent in order to perform the differential diagnosis and contribute to surveillance system of neurological syndrome.

**Keywords: encephalitis, differential diagnosis of central nervous system diseases, BoHV-1, BoHV-5, nested PCR, *multiplex* real time PCR.**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração esquemática de uma partícula vírica da família *Herpesviridae* com os seus componentes. Fonte: Virologia Veterinária (FRANCO; ROEHE, 2007).....5
- Figura 2 - Estrutura e organização dos genomas dos herpesvírus. Organização do BoHV-1 e 5 representado pela letra D. Fonte: Virologia Veterinária (DELHON, 2007). ..... 8
- Figura 3 – Localização dos *primers* externos e internos no genoma para detecção do BoHV-1, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1).....28
- Figura 4 - Localização dos *primers* externos e internos no genoma para detecção do BoHV-5, número de acesso GenBank AY261359.1 (estirpe de referência SV507/99) .....29
- Figura 5 – Representação da localização dos *primers* e sondas utilizados na PCR em tempo real quantitativa para o BoHV-1 e 5 do gene UL-30, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1) e AY261359.1 (estirpe de referência para o BoHV-5 SV507/99). ..... 33
- Figura 6 – Resultado da análise da garantia da qualidade do DNA extraído (controle endógeno), demonstrado amplificação das amostras com exceção do controle negativo. ... 38
- Figura 7 - Produto obtido da amplificação do gene da UL30 para o BoHV-1 com 189 pb e 160 pb para o BoHV-5, para construção da curva padrão, peso molecular de 20 pb..... 39
- Figura 8 - Curva padrão do BoHV-1 produzida a partir de produto amplificado e purificado, no ensaio de qPCR *multiplex*. Valores da reação: erro: 0,0104; eficiência: 1,953; Slope: -3,440. .... 40
- Figura 9 - Curva padrão do BoHV-5 produzida a partir de produto amplificado e purificado, no ensaio de qPCR *multiplex*. Valores da reação: erro: 0,0216; eficiência: 2,015; Slope: -3,286. .... 41
- Figura 10 – Gel de agarose ilustrando amostras positivas para o BoHV-5 nas canaletas 1 e 6 estão representados o marcador molecular de 100bp, canaletas 2 e 3 amostras positivas para o BoHV-5 na primeira amplificação, canaleta 4: controle negativo, canaleta 5: controle positivo (593 pb), canaletas: 7 e 8 amostras positivas para o BoHV-5 na segunda amplificação (*nested* PCR), canaleta 9: controle negativo *nested* PCR, canaleta 10: controle positivo BoHV-5 *nested* PCR (222pb). ..... 44
- Figura 11 - Gel de agarose ilustrando amostras negativas na *nested* PCR para o BoHV-1, representado pelas canaletas 2 a 13, canaleta 1: marcador molecular de 100 pb, canaleta 14: controle negativo e canaleta 15: controle positivo BoHV-1 amplificando um produto de 344 pb..... 44
- Figura 12 – Gel de agarose ilustrando amostra positiva para o BVDV na canaleta 7, amplificando a 290 pb, canaleta 01: marcador molecular de 100 pb, canaletas 2 a 6 e 8 a 18

amostras negativas para o BVDV, canaleta 19: controle negativo, canaleta 20: controle positivo BVDV.....44

Figura 13 – Amostras positivas para o BoHV-5 na qPCR *multiplex*, curva padrão e controle negativo. ....45

Figura 14 - Córtex cerebral de bovino com MENP. Meninge com infiltrado inflamatório mononuclear e congestão vascular (seta amarela); neurópilo congesto com manguito perivascular mononuclear (seta vermelha). (Aumento 200 x e coloração HE). ....48

Figura 15 – Córtex cerebral de bovino. Meninge sem infiltrado inflamatório mononuclear e sem congestão (seta amarela); neurópilo sem manguito perivascular mononuclear e sem congestão (seta vermelha). (Aumento 200 x e coloração HE).....48

Figura 16 – Foto A representa o cultivo celular sem a inoculação da amostra clínica (controle negativo), linhagem MDBK; a foto B representa o efeito citopático de material isolado de SNC, identificação da amostra: LVB 21713/13 caracterizado pela microscopia eletrônica como herpesvírus bovino, no entanto, não identificado pelas técnicas moleculares do presente estudo; a foto C refere-se ao efeito citopático de um herpesvírus bovino isolado de SNC, caracterizado como BoHV-5, identificação da amostra LVB 160/14.....50

Figura 17 – Mapa do estado de São Paulo ilustrando os municípios com bovinos positivos para o BoHV-5.....52

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados na validação da qualidade do DNA extraído, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado.....	25
Quadro 2 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de validação da qualidade de DNA extraído (controle endógeno) .....	25
Quadro 3 – Parâmetros de ciclagem da PCR em tempo real para a validação da qualidade de DNA extraído (controle endógeno) .....	26
Quadro 4 - Sequência de <i>primers</i> da <i>nested</i> PCR para o BoHV-1, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1). .....	27
Quadro 5 - Sequência de <i>primers</i> da <i>nested</i> PCR para o BoHV-5, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado, número de acesso GenBank AY261359.1 (estirpe de referência SV507/99). .....	27
Quadro 6 - Concentração dos reagentes utilizados na reação de <i>nested</i> PCR para BoHV-1. ....	30
Quadro 7 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de <i>nested</i> PCR para BoHV-5. ....	30
Quadro 8 - Parâmetros de ciclagem da <i>nested</i> PCR convencional para BoHV-1 e 5. ....	31
Quadro 9 - Sequência de <i>primers</i> e sondas da qPCR <i>multiplex</i> , localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1) e AY261359.1 (estirpe de referência SV507/99), respectivamente para o BoHV-1 e 5. ....	32
Quadro 10 - Concentração dos reagentes utilizados para a amplificação do produto a ser purificado para a construção da curva padrão .....	34
Quadro 11 - Parâmetros de ciclagem da PCR para obter-se o produto a ser purificado para construção da curva padrão.....	35
Quadro 12 - Concentração dos reagentes utilizados na qPCR <i>multiplex</i> .....	36
Quadro 13 - Parâmetros de ciclagem da qPCR <i>multiplex</i> .....	37
Quadro 14 – Representação dos ensaios, valor obtido na quantificação do produto purificado e valor correspondente em número de cópias de DNA por $\mu$ L. ....	39

Quadro 15 - Média Cq e média da concentração das diluições de BoHV-1, obtidas na qPCR <i>multiplex</i> .....	41
Quadro 16 - Média Cq e média da concentração das diluições de BoHV-5, obtidas na qPCR <i>multiplex</i> .....	42
Quadro 17 – Médias Cq e Concentração das amostras positivas para o BoHV-5.....	46

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Resultado obtido no isolamento viral, qPCR <i>multiplex</i> e histopatológico .....	49
Tabela 2 – Tabela representando a idade dos animais analisados e a porcentagem de animais positivos. ....	53
Tabela 3 - Representação dos animais positivos com relação ao sexo dos animais. ....	54
Tabela 4 – Número de amostras analisadas e amostras positivas para o BoHV-5 de acordo com os meses do ano. ....	55

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Porcentagem das amostras positivas na PCR convencional, para os agentes BoHV-1 e 5, *Neospora caninum* e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).....43
- Gráfico 2 – Número de animais analisados por estado, NI: não informado, outros dez estados correspondem a: Alagoas, Amapá, Ceará, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná e Rio de Janeiro. ....51
- Gráfico 3 – Número de amostras positivas para o BoHV-5 de acordo com a idade do animal .....54
- Gráfico 4 – Gráfico da distribuição dos animais testados de acordo com os meses do ano e a maior ocorrência do BoHV-5 nos meses de dezembro a maio.....56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	=	Marca Registrada
[ ]	=	Concentração
BoHVs	=	Herpesvírus Bovino
BoHV-1	=	Herpesvírus Bovino 1
BoHV-5	=	Herpesvírus Bovino 5
BVDV	=	Vírus da diarreia viral bovina
CO <sub>2</sub>	=	Dióxido de carbono
Cq	=	Ciclo de quantificação
°C	=	Grau Celsius
DICT	=	Dose infecciosa 50% para cultura de tecidos
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
ECP	=	Efeito Citopático
EEB	=	Encefalopatia espongiforme bovina
EHV-1	=	Herpesvírus equino 1
EHV-4	=	Herpesvírus equino 4
gB	=	Glicoproteína B
gC	=	Glicoproteína C
gD	=	Glicoproteína D
gE	=	Glicoproteína E
gG	=	Glicoproteína G
IBR	=	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IPV	=	Vulvovaginite Pustular Infecciosa
IPB	=	Balanopostite Pustular Infecciosa
ICTV	=	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
LVB	=	Laboratório de Viroses de Bovídeos
mg	=	Miligramas
mL	=	Mililitro
µL	=	Microlitro
µM	=	Micromolar
MAPA	=	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDBK	=	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
MENP	=	Meningoencefalite não purulenta
OIE	=	Organização Mundial de Saúde Animal
pb	=	Pares de bases
pH	=	Potencial hidrogeniônico

PCR	=	Reação em cadeia pela polimerase
PI	=	Pós-infecção
PNCRH	=	Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias
qPCR <i>multiplex</i>	=	PCR em tempo real quantitativa <i>multiplex</i>
SFB	=	Soro fetal bovino
SNC	=	Sistema nervoso central
UL	=	<i>Unique Long</i>
US	=	<i>Unique Short</i>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO .....	5
2.2	HERPESVÍRUS.....	5
2.2.1	Nomenclatura e classificação dos herpesvírus .....	5
2.3	CARACTERÍSTICAS DOS HERPESVÍRUS .....	6
2.4	GENOMA DOS HERPESVÍRUS .....	7
2.5	TRANSMISSÃO E PATOGENIA .....	9
2.6	REPLICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS .....	11
2.7	SINAIS CLÍNICOS BoHV-1 .....	11
2.7.1	Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) .....	12
2.7.2	Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e abortamento.....	12
2.7.3	Balanopostite pustular infecciosa (IPB) .....	13
2.8	SINAIS CLÍNICOS BoHV-5.....	14
2.9	EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.10	PROFILAXIA .....	16
2.11	DIAGNÓSTICO .....	17
3.	OBJETIVOS .....	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1	AMOSTRAGEM.....	19
4.1.1	Histopatologia.....	20
4.1.2	Isolamento viral .....	21
4.1.3	Controles: positivo e negativo.....	22
4.1.3.1	Cultura celular e manutenção dos controles positivos .....	22
4.1.3.2	Titulação Viral.....	23
4.2	DETECÇÃO DO BoHV-1 E 5 POR PCR .....	23
4.2.1	Extração DNA.....	23
4.2.2	Garantia da qualidade do DNA extraído (Controle endógeno) .....	24
4.2.2.1	Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) .....	24
4.2.2.2	Concentração dos reagentes .....	25
4.2.2.3	Parâmetros de ciclagem PCR em tempo real sistema SYBR <i>Green</i> .....	26
4.2.3	<i>Nested</i> PCR convencional para detecção do BoHV-1 e 5.....	26
4.2.3.1	Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) .....	26
4.2.3.2	Concentração dos reagentes .....	30
4.2.3.3	Parâmetros de ciclagem PCR convencional .....	31
4.2.4	Eletroforese .....	31

4.2.5	PCR em tempo real quantitativa <i>multiplex</i> .....	32
4.2.5.1	Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) e sondas.....	32
4.2.5.2	Curva padrão da qPCR.....	33
4.2.5.3	Concentração dos reagentes.....	34
4.2.5.4	Parâmetros de ciclagem da PCR para obter-se o produto a ser purificado para construção da curva padrão.....	34
4.2.5.5	Quantificação do produto purificado.....	35
4.2.5.6	Concentração de reagentes para PCR em tempo real <i>multiplex</i> .....	36
4.2.5.7	Parâmetros de ciclagem PCR em tempo real <i>multiplex</i> .....	36
4.2.5.8	Determinação da sensibilidade analítica qPCR <i>multiplex</i> .....	37
4.2.5.9	Especificidade analítica da PCR em tempo real.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	GARANTIA DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO (CONTROLE ENDÓGENO)....	38
5.2	PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA CURVA PADRÃO.....	39
5.3	SENSIBILIDADE ANALÍTICA: DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DA qPCR <i>MULTIPLEX</i> .....	40
5.4	ESPECIFICIDADE ANALÍTICA.....	42
5.5	DETECÇÃO DO BoHV-1 E 5 EM AMOSTRAS CLÍNICAS.....	43
5.5.1	RESULTADOS DA PCR CONVENCIONAL.....	43
5.5.1.1	Interpretação do resultado da PCR convencional.....	43
5.5.2	RESULTADOS DA qPCR <i>MULTIPLEX</i> .....	45
5.5.3	RESULTADOS DO ISOLAMENTO VIRAL E HISTOPATOLOGIA.....	47
5.5.4	RESULTADOS DO LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO.....	50
6.	CONCLUSÃO.....	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8.	APÊNDICES.....	73
9.	ANEXOS.....	78

## 1. INTRODUÇÃO

As encefalites são lesões inflamatórias do Sistema Nervoso Central (SNC) que podem ser causadas por diversos agentes, priônicos, virais, bacterianos, parasitários e por outros não infecciosos. Alguns dos agentes são zoonoses, por isso impactam diretamente a saúde pública como o vírus da raiva, o príon agente causador da encefalopatia espongiforme bovina (EEB), a *listeria monocytogenes*, outros infectam apenas animais como os vírus da família *Herpesviridae*, a leucose enzoótica bovina, vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Esta diversidade de agentes implica em esforços por parte do Sistema de Defesa Sanitária Animal para realizar o diagnóstico diferencial e confirmação do agente para aplicar as medidas específicas de controle (CLAUS; ALFIERI; ALFIERI, 2002; BARROS et al., 2006).

O diagnóstico diferencial de síndromes neurológicas em bovinos tornou-se importante com o aparecimento da EEB, popularmente conhecida como “doença da vaca louca”, teve seu auge na década de 1990. O surgimento desta doença priônica promoveu mudanças nos requisitos sanitários dos países para garantir a inocuidade quanto à EEB (BRASIL, 2008).

Em 2013 apenas quatro casos de EEB foram notificados no mundo, evidenciando o sucesso das medidas preventivas adotadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual por meio da Instrução Normativa nº 44, de 17 de setembro de 2013, institui o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (PNEEB) que juntamente com o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias (PNCRH) fortalecem o sistema de vigilância das encefalites e encefalopatias, pois fornecem informações epidemiológicas que servem de base às autoridades de Defesa Sanitária Animal na tomada de decisões e gerenciamento sanitário destas enfermidades. O PNCRH estabelece como responsabilidade institucional e competência ao laboratório credenciado processar as amostras suspeitas enviadas para confirmação do diagnóstico de raiva, encaminhando para o diagnóstico diferencial as amostras negativas acompanhada do Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica – FORM SN (Anexo A) (BRASIL, 2009).

Para avaliação da situação sanitária, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) considera as medidas de prevenção, vigilância e mitigação de risco adotada por um país nos últimos sete anos. No Brasil, dois casos de EEB atípica foram notificados, o primeiro em dezembro de 2012, ocorrido no estado do Paraná (Anexo B), e o segundo no Mato Grosso, em maio de 2014 (Anexo C), classificados como casos atípicos (esporádicos e espontâneos). Nestes dois casos, todas as ações do sistema de defesa sanitária foram

sustentadas nas recomendações sanitárias do Código de Animais Terrestres da OIE, visando cumprir com os seus dispostos, mantendo assim o Brasil na classificação de risco insignificante para a EEB (OIE, 2014). Salienta-se que desde 1990, o MAPA aplica medidas de prevenção e vigilância dessa doença, que são atualizadas constantemente, em consonância com as informações científicas disponíveis e as recomendações da OIE. Por esse motivo, ante as ações, consolidadas há mais de duas décadas no Brasil, o eventual registro da enfermidade não configura risco sanitário, visto que as medidas de mitigação de risco atuais são suficientes para evitar a reciclagem e aumento do agente causador. Contudo em vista da ocorrência dos dois casos, evidencia-se a necessidade de fortalecer as medidas de vigilância e mitigação de risco. O conhecimento dos agentes causais contribuirá para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle mais efetivos dessas infecções, buscando minimizar possíveis prejuízos sobre a cadeia produtiva, que chega a ser de aproximadamente 44 milhões de dólares em países da América Latina (BORDIGNON et al., 2005).

No Brasil foram identificados diversos agentes causadores de encefalites, sendo a raiva considerada uma das principais, seguida pelos herpesvírus bovinos (BoHVs) (SANCHES et al., 2000).

Os herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e causam perdas econômicas na pecuária de corte e leiteira mundial (ICTV, 2013; FAUQUET et al., 2004).

O BoHV-5 é frequentemente associado a meningoencefalites não supurativa, atinge animais de todas as idades, mas com maior frequência bovinos jovens (RISSI et al., 2007); induz a uma infecção subclínica ou de severidade moderada em adultos e encefalite letal em animais jovens, sendo uma doença frequentemente descrita na Argentina e Brasil (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2003).

Estudos realizados no semiárido nordestino determinando as doenças ocorridas no sistema nervoso indicam que o BoHV-5 foi responsável por 2,7% (3/111) dos casos (GALIZA et al., 2010). Fonseca et al. (2011) detectaram cerca de 15% (10/65) em amostras de encéfalo provenientes de várias regiões do estado de Minas Gerais; Sanches et al. (2000) encontraram em 305 casos de encefalite em bovinos da região Sul do Brasil 49,51% positivos para raiva e 4,59% positivos para meningoencefalite herpética.

O BoHV-1 é um patógeno de grande importância econômica, pois é o agente causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) em vacas, e balanopostites (IPB) em touros (KAHRS, 2001); pode causar problemas reprodutivos tais como abortamento e redução de fertilidade (MILLER, 1991; FRANCO; ROEHE, 2007). Existem também relatos de doenças neurológicas causadas pelo BoHV-1

(BATISTA et al., 2010). Com estes relatos nota-se a importância da realização do diagnóstico diferencial entre as estirpes BoHV-1 e 5.

A infecção pelo BoHV-1 encontra-se amplamente disseminada em rebanhos bovinos por todo o mundo, excetuando-se apenas alguns países da Europa que implantaram programas de erradicação desta virose (RAVISHANKAR et al., 2013; BILGE DAGALP et al., 2012).

Já a distribuição geográfica da infecção pelo BoHV-5 não é bem conhecida, principalmente devido à reatividade sorológica cruzada com o BoHV-1 pela prova de vírus neutralização (VN). No entanto, casos esporádicos de meningoencefalites causados pelo BoHV-5 já foram descritos na Austrália, Estados Unidos, Itália, e Hungria (MAIDANA et al., 2013).

O diagnóstico destes agentes pode ser realizado por métodos indiretos como: vírusneutralização, imunofluorescência, imunoperoxidase, porém como o BoHV-1 e 5 apresentam 85% de similaridade em suas sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA), isto dificulta a distinção correta entre estes dois genótipos, pois pode ocorrer reações cruzadas (MEYER et al., 2001). A detecção por meio de métodos diretos inclui o isolamento viral, imunofluorescência, hibridização *in situ* e testes moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) que permite a distinção entre eles e adquiriu grande importância na área de diagnóstico, pois ao comparar a técnicas como o isolamento viral, apresenta maior rapidez e sensibilidade diagnóstica na detecção do DNA viral em amostras biológicas (OIE, 2012).

Os genes e as proteínas codificadas envolvidos na neurovirulência de *alphaherpesvirus* são classificados em três grupos: as enzimas envolvidas no metabolismo de ácido nucleico, os fatores que modulam a resposta imunitária e as glicoproteínas virais (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

As glicoproteínas virais desempenham importante papel na virulência, mediando adsorção e a penetração do vírion na célula hospedeira, além da disseminação célula a célula e a indução de resposta imune do hospedeiro, como ligações às imunoglobulinas e componentes do sistema imune (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010; ROLLOF, 2014). As glicoproteínas B (gB), C (gC) e D (gD) são imunodominantes e estão presentes em maior concentração, sendo importantes para o início do processo de infecção viral, e contribuem com a adsorção viral ligando-se a receptores celulares da membrana celular (ROLLOF, 2014). Já as gE e gG estão envolvidas na transmissão do vírus célula a célula, sendo a gG necessária para manter a adesão entre as células infectadas (NAKAMICHI; MATSUMOTO; OTSUKA, 2002).

A gG tem a particularidade de ser útil na diferenciação do BoHV-1 e 5, uma vez que a região codificadora apresenta na sua porção final uma deleção no genoma do BoHV-1, em

comparação com o BoHV-5, além de pequenas trocas e inserções ao longo do gene (OLIVEIRA, 2006).

A DNA polimerase codificada pelo gene UL30 foi fortemente associado à neurovirulência em herpesvírus equino 1 (EHV-1) (NUGENT et al., 2006). A variação ocorrida em um único aminoácido neste gene durante a síntese confere a neurovirulência das cepas de EHV-1, sendo que ocorre em regiões altamente conservadas (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Na Austrália, Diallo, Corney e Rodwell (2011) padronizaram uma PCR em tempo real quantitativa *multiplex* (qPCR *multiplex*), detectando assim o BoHV-1 e 5 através desta região do gene, sendo o único trabalho na literatura compulsada para detecção destes agentes a partir desta região, demonstrou ser um método rápido e sensível. Considerando que o BoHV-5 ocorre com frequência no Brasil, estudos envolvendo este gene podem contribuir a compreensão da neurovirulência deste agente.

O uso da PCR convencional como ferramenta de detecção do BoHV-1 e 5 têm sido frequentemente utilizada, Maidana et al. (2013) utilizou a PCR *multiplex* seguida de restrição enzimática (RFLP – *Restriction length polymorphism analysis*), Morán et al. (2013) utilizaram a *nested* PCR, para detecção da região da gD e gC do genoma do BoHV-1 e 5, respectivamente, em amostras de sêmen. No Brasil: Oliveira et al. (2011) utilizou a *nested* PCR para detectar o BoHV-1 e 5 em sêmens, Isernhagen et al. (2011) detectou o DNA viral do BoHV-5 em bezerros infectados experimentalmente com BoHV-5, Lunardi et al. (2009) e Fonseca Júnior et al. (2011) adotaram a PCR *multiplex*.

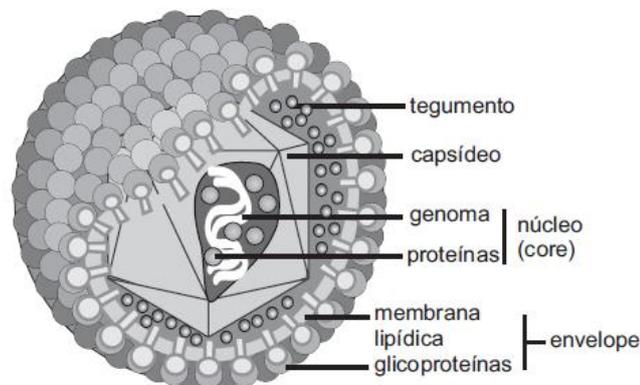
Apesar da existência de diversos trabalhos na literatura utilizando a PCR, ainda são poucos os relatos do diagnóstico de BoHV-1 e 5 por PCR em tempo real, existem trabalhos de detecção do BoHV-5 com sistema SYBR *Green* em embriões bovinos (CARDOSO et al.; 2013) e em amostras parafinadas de cérebro bovino (PEDRAZA-ORDOÑEZ et al., 2013). Para o BoHV-1 é comumente o uso do protocolo de PCR em tempo real recomendado pela OIE (2012).

Tendo em vista que a meningoencefalite herpética bovina é descrita frequentemente no Brasil, e os métodos de diagnóstico descritos para detecção são geralmente técnicas de PCR convencional o aprimoramento de métodos de diagnóstico rápidos, precisos, sensíveis e que permitam a caracterização destes agentes com a finalidade de confirmar em tempo oportuno o agente causal das encefalites e encefalopatias permitirá fortalecer o sistema de vigilância dos herpesvírus e contribuirá na manutenção da condição do Brasil como país de risco insignificante para EEB.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Os vírions da família *Herpesviridae* contêm envelope composto por uma membrana lipídica e glicoproteínas, capsídeo icosaédrico composto por 162 capsômeros e o diâmetro pode variar entre 120 e 250 nanômetros. Entre o capsídeo e o envelope existe uma camada proteica denominada tegumento (Figura 1) (FAVIER; MARIN; PÉREZ, 2012).



**Figura 1 - Ilustração esquemática de uma partícula vírica da família *Herpesviridae* com os seus componentes. Fonte: Virologia Veterinária (FRANCO; ROEHE, 2007)**

### 2.2 HERPESVÍRUS

#### 2.2.1 Nomenclatura e classificação dos herpesvírus

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2013) o BoHV-1 e 5 são membros da família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*.

A família *Herpesviridae* abriga um grupo grande e diversificado de vírus encontrados em virtualmente todas as espécies de vertebrados, composta por três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (LOVATO, 2007). Os vírus dessa família possuem uma importante propriedade biológica em comum, que é a capacidade de estabelecer infecções latentes nos seus hospedeiros; os vírus da subfamília

*Alphaherpesvirinae* apresentam um ciclo replicativo rápido e lítico em cultivo celular (ROIZMAN; PELLET, 2007).

O BoHV-1 é um importante patógeno que atinge os bovinos, causando uma variedade de síndromes, sendo subdivido em três diferentes subtipos virais: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b (D'ARCE et al., 2002; TRAESEL et al., 2014). O BoHV-1.1 está associado à IBR, isolado de animais com problemas respiratórios e abortamentos; o BoHV-1.2a está normalmente vinculado à infertilidade e abortamento; o BoHV-1.2b, isolado principalmente de casos de IPV e IPB, geralmente não relacionado a casos de abortamento (MUYLKENS et al., 2007).

Até 1992 existia o subtipo, BoHV-1.3, isolado de casos de meningoencefalite, porém estudos comparativos baseados no mapeamento dos sítios de restrição do DNA viral do BoHV- 1 e 5 e reatividade a anticorpo monoclonal, indicam que estes diferem nas propriedades genômicas e antigênicas, permitindo assim a reclassificação do BoHV-1.3 para o BoHV-5 realizada por Roizman et al. (1992). As cepas de BoHV-5 são denominadas segundo padrões de enzimas de restrição que clivam fragmentos do DNA genômico, são caracterizadas como subtipos de “a” semelhantes a cepa da Austrália N569, “b” assemelham-se a cepa A663 da Argentina e “não a, não b” cepas brasileiras (D'ARCE et al., 2002; DEL MÉDICO ZAJAC, et al., 2010). Porém, estudos realizados por Maidana et al. (2011) utilizando o gene UL27 que codifica a gB, indicam que as cepas do subtipo “a” estão circulando com maior frequência na Argentina, no entanto, recentemente Silva (2013) relatou um caso clínico de BoHV-5 ocorrido no estado de Goiás sendo caracterizado como BoHV-5 subtipo “a”, demonstrando a circulação do subtipo “a” também no Brasil. O subtipo “b” esteve presente na Argentina apenas nos anos de 1982 a 1984; com isso maiores estudos são necessários para avaliar se o subtipo “b” certamente não existe mais e se surgirão subtipos “não a, não b” na Argentina, uma vez que estão presentes no Brasil segundo descrição de D'arce et al. (2002).

### **2.3 CARACTERÍSTICAS DOS HERPESVÍRUS**

Os herpesvírus possuem como principal característica a capacidade de estabelecer infecções latentes, mantendo-se principalmente em neurônios ganglionares sensoriais do sistema nervoso periférico sem se replicar e persistindo por toda vida do animal (MORÁN et al., 2013). Essa reativação viral pode ocorrer espontaneamente, sob condições variadas de estresse ou através da administração de corticosteróides, manifestando ou não sinais clínicos (RAVISHANKAR et al., 2013). Durante a reativação o vírus é transportado via

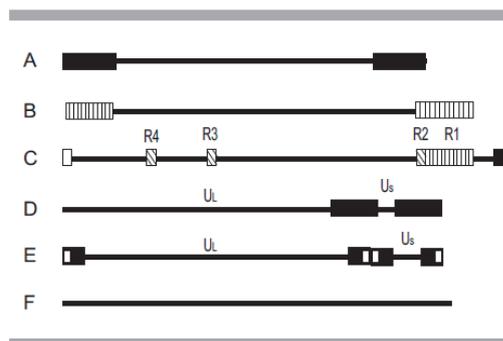
nervosa, a partir de gânglios periféricos, retornando aos focos primários da infecção (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

Os herpesvírus são instáveis no meio ambiente e demonstram sensibilidade a solventes orgânicos como acetona, clorofórmio, álcool etílico, éter etílico (GALVÃO, 2012); são sensíveis também a ácidos e ao ressecamento e algumas enzimas proteolíticas que os tornam não infecciosos; são inativados por raios gama ou radiações ultravioletas (UV) (GUSTAFSON, 1981). Os vírus envelopados são relativamente sensíveis ao potencial hidrogeniônico (pH), pois podem ser inativados a um pH pouco abaixo do neutro (5 a 6). As proteínas do envelope desnaturam em poucos minutos a temperaturas de 55 a 60°C, tornando os vírions incapazes de interagir produtivamente com receptores celulares e iniciar a infecção (FLORES, 2007). O BoHV-1 é estável a uma faixa de pH entre 6,0-9,0, mas lábil a pH 4,5-5,0 (GUSTAFSON, 1981).

## 2.4 GENOMA DOS HERPESVÍRUS

O genoma do BoHV-1 e 5 consiste de uma molécula de DNA de cadeia dupla linear, com cerca de 135 a 139 kilobases e 70 genes, sendo que a maioria das proteínas codificadas e as suas funções já foram identificadas ou deduzidas (CHOWDHURY; SHARMA, 2012; FAVIER; MARIN; PÉREZ, 2012)

Os genomas dos herpesvírus variam com relação à extensão, composição (conteúdo de GC-AT) e presença de sequências repetidas terminais e internas. De acordo com a organização genômica, esses vírus são divididos em seis grupos designados pelas letras A a F (Figura 2); sendo que o BoHV-1 e 5 possuem a organização representada pela letra D, consistindo de uma região única longa (UL - *Unique Long*) e uma região única curta (US – *Unique Short*), representadas pela linha na figura, e flanqueada por duas regiões repetitivas: região interna repetitiva (IR) e região terminal repetitiva (TR), representada pelos blocos (DELHON et al., 2003; ROIZMAN; PELLET; 2007).



**Figura 2 - Estrutura e organização dos genomas dos herpesvírus. Organização do BoHV-1 e 5 representado pela letra D. Fonte: Virologia Veterinária (DELHON, 2007).**

O genoma do BoHV-5 possui 138.390 pares de bases (pb) sendo maior que o do BoHV-1 com 2518 pb a mais; possui 72 genes com sequências traduzíveis, denominadas *Open Reading Frame (ORF)*. Os BoHV são vírus heterogêneos, não diferenciados entre si morfológicamente pela microscopia eletrônica, apresentam cerca de 87% de similaridade de nucleotídeos e as proteínas do BoHV-5 são muito semelhantes às do BoHV-1, com aproximadamente 82% de aminoácidos idênticos, todas as ORFs presentes no BoHV-5 estão presentes no BoHV-1, com exceção da UL 0.5 (DELHON et al., 2003).

São codificadas aproximadamente 70 proteínas, das quais dez são glicosiladas: gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM desempenham papel importante na virulência mediando a ligação e entrada do vírion à célula hospedeira, fusão e propagação célula a célula. A penetração do vírus requer a fusão única do envelope viral com a membrana plasmática e depende da ação das gB, gD, gH, e gL (WILD et al., 1998).

As glicoproteínas também são os principais antígenos reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro infectado devido a sua localização dentro do envelope do vírion (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

Dentre estas glicoproteínas estruturais destacam-se as gB, gC e gD que possuem grande potencial imunogênico e permitem a diferenciação entre os tipos BoHV-1 e 5 (CHOWDHURY, 1995). A gC é muito importante no estímulo do sistema imunológico, ativando a produção de anticorpos neutralizantes, sendo-lhe atribuída a função de adsorção do vírus à célula hospedeira (OKAZAKI et al., 1987). A gD é essencial para a replicação viral e sugere-se que também esteja envolvida na adsorção, penetração e fusão celular (FEHLER et al., 1992).

A gB está envolvida nas etapas de adsorção, penetração e fusão celular e durante a replicação viral (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; HUGHES; BABIUK, 1990), tem se mostrado adequada para o estudo de relações genéticas entre vários tipos de *alphaherpesvirus* de ruminantes, com 87,4% de identidade entre os nucleotídeos do BoHV-1

e 5. As maiores similaridades entre os dois vírus têm sido descritas nas proteínas envolvidas na replicação e processamento do DNA viral (UL5, UL48, UL39, UL15, entre outras) demonstrando mais de 95% de identidade de aminoácidos, a UL30 também envolvida na replicação viral apresenta um menor grau de conservação 90%. No entanto, existem regiões menos conservadas como a gG com 72%, responsável pela transmissão do vírus célula a célula, e na prevenção de apoptose em linhagens celulares (DELHON et al., 2003; MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

A timidina quinase é uma das proteínas classificada como não estrutural, embora esta enzima não seja de fundamental importância para a replicação do vírus em cultivo celular, atribui-se a ela o envolvimento no processo de reativação do BoHV em estado de latência (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

As proteínas não estruturais BICP0, BICP4, BICP22, pertencem ao grupo das menos conservadas do BoHV-5. As proteínas do BoHV-5 são muito similares às do BoHV-1 com 82% de aminoácidos idênticos. Entre os BoHVs não específicos aos bovinos a maior similaridade encontra-se entre os EHV-1 e EHV-4 com 28 a 69% de identidade (DELHON et al., 2003).

## **2.5 TRANSMISSÃO E PATOGENIA**

Os animais infectados eliminam o vírus pelas mucosas nasais, oculares, genital e através do sêmen. A transmissão horizontal é a mais importante, e ocorre pelo contato direto com animais infectados através da inalação de aerossóis ou pelo contato genital durante o acasalamento (WYLER; ENGLES; SCHWYZER, 1989; MARS; JONG; VAN OIRSCHOT, 2000). A transmissão pelo contato indireto também pode ocorrer através de fômites contaminados, inseminação artificial (partida de sêmen contaminado) e transferência de embriões (MUYLKENS et al., 2007). A transmissão vertical pode ocorrer em qualquer fase da gestação.

As principais portas de entrada do vírus são as mucosas do trato respiratório, genital e epitélio conjuntival (STRAUB, 1990). Ao encontrar uma célula susceptível, ocorre a fusão do vírus com o citoplasma da célula, com o auxílio de glicoproteínas do envelope, penetrando até o núcleo celular desencadeando a replicação primária nas células epiteliais, bem como em células da submucosa e tecido conjuntivo, provocando a lise celular e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da infecção, como congestão local, presença de secreções, lesões vesiculares ou erosivas (PASTORET et al., 1982; ASHLEY et al., 1994). No momento em que ocorre a ligação do vírion com a célula, se estabelece uma ligação

entre as gB e gC, responsáveis pela adsorção e penetração; e os receptores da superfície celular.

A replicação viral no sistema respiratório leva a uma alta produção do vírus que é excretado a partir das secreções nasais e constitui uma fonte de transmissão muito eficaz durante a fase aguda da infecção (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Após a infecção primária, o vírus é transportado por monócitos a órgãos alvo incluindo sistema nervoso, trato digestivo ou feto (HALFEN; VIDOR, 2001). Ao atingir as terminações nervosas o vírus pode se replicar ativamente ou estabelecer a infecção latente não expressando seus antígenos virais ou replicação (FRANCO; ROEHE, 2007; VOGUEL et al., 2003).

A replicação primária pode ocorrer nas mucosas nasal, vaginal, orofaríngea, dependendo da rota de infecção. A principal via de acesso do vírus ao encéfalo é a mucosa nasal (VOGUEL et al., 2003; BELTRÃO et al., 2000) contudo outras rotas de acesso podem ser utilizadas, tais como as fibras sensoriais e autonômicas que compõem o nervo trigêmeo, porém, este é um acesso mais lento e menos eficiente (BELTRÃO et al., 2000; DIEL et al., 2005). A presença do vírus no nervo trigêmeo e alterações microscópicas nos gânglios trigeminal aparecem em 5 a 7 dias pós-infecção (PI) e simultaneamente lesões nos anteriores cerebrais como córtex e medula sugerem que o BoHV-5 também atinge o cérebro por transporte axonal de neurônios bipolares dos nervos olfatórios para os bulbos olfativos (PEREZ et al., 2002).

O vírus ao atingir o SNC, normalmente induz a uma meningoencefalite fatal em bovinos após 8-10 dias PI (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002); no entanto, alguns casos de infecção subclínica (VOGUEL et al., 2003) ou doença moderada (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006) foram relatados. Se os animais sobreviverem, uma infecção latente é estabelecida nos gânglios sensoriais (PEREZ et al., 2002)

O período de incubação da infecção de bovinos pelo BoHV-5 é geralmente de 10 a 15 dias, entretanto, em casos onde o vírus estabelece latência, a doença pode se manifestar vários meses após a infecção (PEREZ et al., 2002). O gânglio trigêmio é o principal local de latência, embora o DNA viral também possa ser detectado no córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo, ponte, medula, cerebelo e bulbo olfatório (VOGEL et al., 2003). A reativação e excreção do vírus podem ocorrer em situações de estresse ou mediante administração de corticosteroides (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003), o vírus retorna ao sítio de infecção primária, onde replica ativamente e podem ser excretados (VOGEL et al., 2004). A eliminação do BoHV-5 ocorre até o 17º dia PI nas secreções nasais e até o nono dia PI nas secreções orais; o pico de eliminação viral ocorre entre quatro a sete dias PI (BARROS et al., 2006).

## 2.6 REPLICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS

O vírus incorpora o seu DNA viral no núcleo celular, onde irá efetuar a sua replicação, que consiste em três etapas classificadas de acordo com o tempo de expressão gênica: genes *alpha* ou imediatos são os primeiros a serem expressos; seguidos dos genes *beta* ou iniciais, proteínas que sintetizam e empacotam o DNA e genes *gamma* ou tardios que sintetizam a maioria das proteínas do vírion (ROIZMAN et al., 1992).

Na fase imediata são sintetizadas proteínas regulatórias da replicação viral, necessárias para a expressão gênica como a proteína UL9 que se liga na origem de replicação, a UL29 que se liga em DNA de fita simples e proteínas do complexo helicase-primase de pré-síntese viral. Este complexo é formado pela UL42 (fator de processividade da DNA polimerase) e UL30 (DNA polimerase) (DELHON, 2007; HAY; RUYECHAN, 2007). Na fase inicial, o DNA do vírus transcrito pela RNA polimerase viral, expressa duas proteínas importantes: a timidina quinase e a DNA polimerase, principais responsáveis pela replicação do DNA viral na célula infectada (BOEHMER; LEHMAN, 1997).

A produção das proteínas estruturais do vírion e/ou proteínas envolvidas na morfogênese é realizada na fase *gamma* ou tardia, responsáveis pela montagem da partícula viral e das demais proteínas funcionais (BOEHMER; LEHMAN, 1997).

A montagem do capsídeo e a encapsulação do DNA viral ocorre ainda no interior do núcleo, através da fusão com membrana nuclear no momento de saída da célula ou através de vesículas derivadas do complexo de Golgi (FLORES; KREUTZ, 2007). Após esse processo o vírion está pronto e capaz de infectar novas células, iniciando novamente o processo de infecção celular (KNIPE; CLIFFE, 2008).

## 2.7 SINAIS CLÍNICOS BoHV-1

O BoHV-1 afeta principalmente os tratos respiratórios e genital dos bovinos, sendo divididos em sinais característicos da IBR, IPV e IPB. A severidade dos achados clínicos parece estar relacionada ao subtipo do vírus, o estado imunológico do animal no momento da infecção, aos agentes estressores ambientais e à idade do animal, sendo considerado um dos agentes mais importantes do complexo de doenças respiratórias dos bovinos (DELFAVA, PITUCO, D'ANGELINO; 2002). Raramente há ocorrência conjunta das formas genital e respiratória da doença (RADOSTIS et al., 2007). Em 2010 Batista et al., relataram a

ocorrência de BoHV-1.1 e BoHV-1.2b em forma infecciosa em encéfalos de bovinos com suspeita diagnóstica de raiva, no Rio Grande do Sul.

### **2.7.1 Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)**

A forma respiratória da infecção em bovinos causada pelo BoHV-1, conhecida como IBR, está geralmente associada ao BoHV-1.1, é contagiosa e aguda (FENNER et al., 1992, RIET-CORREA et al., 1996). Esta infecção apresenta-se de forma subclínica ou severa, podendo resultar em morbidade de até 100%, com mortalidade geralmente ausente ou baixa (RAVISHANKAR et al., 2013), mas podem ocorrer complicações em decorrência de infecções bacterianas secundárias ou de outras infecções virais superpostas, resultando em severa pneumonia, levando o animal a morte (ENGELS; ACKERMANN, 1996; PIDONE; GALOSI; ETCHEVERRIGARAY, 1999).

As manifestações clínicas da IBR caracterizam-se por ocorrência de febre (40-42°C) e inflamações que afeta o trato respiratório superior até os brônquios; depressão, anorexia, apatia, dispneia, taquipneia, tosse, aumento dos linfonodos locais, corrimento nasal seroso ou serohemorrágico e posteriormente descargas mucopurulentas devido à infecção secundária por bactérias. (SPILKI et al., 2004). A mucosa nasal se torna hiperêmica e as lesões iniciais de difícil visualização, evoluem de pústulas locais para grandes áreas superficiais, hemorrágicas, cobertas por uma membrana diftérica (FENNER et al., 1993).

Alguns animais infectados pelo BoHV-1.1 podem apresentar opacidade da córnea na região próxima à conjuntiva, secreção ocular profusa, inicialmente serosa e posteriormente descargas mucopurulentas oculares, conjuntivite e fotofobia, lacrimejamento, sialorreia e ulcerações na mucosa oral (FENNER et al., 1992; RIET-CORREA et al., 1996; SPILKI et al., 2004).

### **2.7.2 Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e abortamento**

Os casos de abortamentos e infertilidade estão geralmente associados ao BoHV-1.2a, podendo ocorrer principalmente entre o quinto e oitavo mês de gestação (FRANCO; ROEHE, 2007). Bezerros infectados durante os estágios finais de seu desenvolvimento fetal podem apresentar a forma sistêmica da enfermidade, apresentando infecção aguda, com surgimento de lesões necróticas nas mucosas do trato respiratório e digestivo, no fígado,

rins e quadros de encefalite que levam o bezerro ao óbito em poucas horas após o parto (RADOSTIS et al., 2007).

O subtipo BoHV-1.2b está associado à infecção venérea ocorrida em fêmeas, mais conhecida como IPV, apresenta-se entre um a três dias após a monta com animal infectado (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977) e caracteriza-se por congestão e edema na mucosa vulvar, com formação de pequenas vesículas de aproximadamente 1 a 2 milímetros, distribuídas na superfície da mucosa genital que eventualmente se tornam coalescentes e com secreção límpida podendo tornar-se mucopurulenta (HENZEL et al., 2008). As lesões cicatrizam-se em torno de 10 a 14 dias (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977). Podem ocorrer também conjuntivite, enterite, encefalite e distúrbios reprodutivos, promovendo assim mortalidade embrionária precoce e/ou tardia, com repetições de cio, mortalidade fetal com aborto; natimortos e infertilidade (STRAUB, 1991).

### **2.7.3 Balanopostite pustular infecciosa (IPB)**

Infecção genital manifestada em bovinos machos, associada usualmente ao BoHV-1.2b, mais conhecida como IPB e é considerado uma enfermidade de patogenicidade reduzida (RAVISHANKAR et al., 2013).

A IPB ocorre de forma clínica ou subclínica (FENNER et al., 1993, VAN OIRSCHOT, 1995). A sintomatologia clínica assemelha-se a IPV, tais como febre, anorexia e depressão podem estar presentes e eventualmente são agravadas por infecções bacterianas secundárias, incluindo inflamações nas áreas genitais do pênis e prepúcio (THIELSCHER; HUTH, 1986). Após um período de um a três dias PI, a mucosa do pênis e prepúcio tornam-se hiperêmicas, e apresentam pequenas vesículas. Essas lesões começam como pequenas vesículas e progressivamente aumentam de tamanho e eventualmente coalescem e aparecem cobertas por uma secreção fibrinosa branco amarelado (VOGEL et al., 2004).

Tanto na IPV quanto na IPB podem ocorrer lesões ulcerativas e a micção nos machos é mais frequente e dolorosa, as fêmeas levantam a cauda (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999; PUENTE, 2003; HENZEL et al., 2008).

Destaca-se a sua importância em touros utilizados para inseminação artificial, pois as partículas virais presentes nas lesões de touros acometidos pelo sêmen, constituindo uma importante via de eliminação e de transmissão para fêmeas susceptíveis. Henzel et al. (2008) inocularam em bezerras um isolado de BoHV-1.2 de casos de IPB e observaram congestão e edema na mucosa vulvovestibular, formação de pequenas vesículas e pústulas, que durante a progressão clínica, aumentaram de tamanho e eventualmente se tornaram

coalescentes, recobertas por um exsudato de coloração amarelada. Neste experimento a administração de dexametasona no dia 55 PI resultou em recrudescência clínica da infecção latente, porém com sinais menos severos e com menor duração do que na infecção aguda.

Experimento realizado por Vogel et al. em 2004 com o mesmo isolado de BoHV-1.2 inoculado em touros intraprepucialmente e o qual obteve resultados severos de IPB, no entanto ao ser administrado com dexametasona no dia 60 PI um dos touros desenvolveu sinais clínicos da IPB, porém com sinais leves; contrastando assim com o conceito de que a reativação do animal infectado por *alphaherpesvirus* é raramente acompanhada por sinais clínicos recrudescente. Por outro lado, corrobora com observações prévias que reativações de infecções latentes pelo BoHV-5 e outros *alphaherpesvirus* bovinos induzidas espontaneamente ou por administração de dexametasona em bovinos e em coelhos infectados experimentalmente é frequentemente acompanhada de doenças neurológicas (PEREZ et al., 2002).

## **2.8 SINAIS CLÍNICOS BoHV-5**

O BoHV-5 é o agente da meningoencefalite não supurativa, frequentemente fatal em bovinos jovens, os sinais clínicos apresentados pelos animais afetados são depressão, anorexia e fraqueza geral, dificuldades de respiração incoordenação motora, cegueira, tremores musculares, marcha para trás ou andar em círculos, pressão da cabeça frente a paredes e cercas, sialorreia, nistagmo, depressão profunda, isolamento do rebanho, disfagia (inabilidade para ingestão de água ou apreensão de alimentos), paralisia da língua, bruxismo, decúbito prolongado com dificuldade para voltar à estação e, decúbito esternal evolução para decúbito lateral, movimentos de pedalagem, opistótono, crises de convulsões e morte (COLODEL et al., 2002; ELIAS; SCHILD; RIET-CORREA, 2004; BARROS et al., 2006; RISSI et al., 2006; HALFEN; RIET-CORREA, 2007; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010; LADELFA et al., 2011). Em alguns rebanhos observou-se corrimento nasal, ocular e febre, anteriormente aos sinais neurológicos (SCHUDEL et al., 1986; SALVADOR et al., 1998).

## **2.9 EPIDEMIOLOGIA**

O BoHV-1 está mundialmente disseminado, ocasiona grandes prejuízos econômicos aos países que exploram a bovinocultura (ACKERMANN; ENGELS, 2006, MUYLKENS et

al., 2007); com exceção de alguns países da Europa onde a infecção foi erradicada com a identificação e eliminação de animais sororeagentes (VAN OIRSCHOT; KAASHOEK; RIJSEWIJK, 1996). No Brasil, os primeiros levantamentos sorológicos da doença foram descritos em 1962, na Bahia, por Galvão et al. (1962). O primeiro caso de BoHV-1 foi isolado no estado da Bahia relatado por Alice (1978), proveniente de caso de vulvovaginite. A prevalência do BoHV-1 nos rebanhos bovinos apresentam taxas variadas dependendo do tamanho do rebanho e manejo (STRAUB, 2001) e tem sido detectada extensivamente nos rebanhos brasileiros, apresentando de 19% a 85% de animais sororeagentes (QUINCOZES, 2005).

Com relação à distribuição da enfermidade por categorias zootécnicas e faixas etárias, alguns trabalhos realizados no Brasil demonstram que a ocorrência do BoHV-1 aumenta com a idade (MELO, 1998; DEL FAVA, 2001).

A distribuição geográfica da infecção pelo BoHV-5 não é bem conhecida, pois o agente apresenta reatividade sorológica cruzada com o BoHV-1, o que impede o estabelecimento da proporção de animais supostamente infectados pelo BoHV-1, e que na verdade foram infectados pelo BoHV-5 (ROEHE et al., 1997). Estudos realizados em fêmeas com idade superior ou igual a 24 meses, demonstraram reatividade cruzada de 92,98% em rebanhos do estado de São Paulo e 76,47% no Rio Grande do Sul, realizados respectivamente por Silva (2011) e Holz et al. (2009).

Surtos de meningoencefalite herpética, ocasionada pelo BoHV-5 já foram relatados em vários países como Austrália (DIALLO et al., 2010; JOHNSTON; SIMMONS; McGAVIN, 1962), Estados Unidos (BARENFUS et al., 1963), Hungria (BARTHA et al., 1969), Canadá (BECK, 1975) e na Colômbia em estudo retrospectivo (PEDRAZA-ORDOÑEZ et al., 2013), no entanto, atualmente os relatos de surtos ocorrem com maior frequência na Argentina (MAIDANA et al., 2011) e em diversos estados do Brasil como Rio Grande do Sul (SCHILD et al., 1994; ELIAS et al., 2004), São Paulo, Mato Grosso do Sul (SALVADOR et al., 1998), Rio de Janeiro, Minas Gerais (GOMES et al., 2002), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Goiás (PAULA et al., 2005; SILVA, 2013), Pará (RIET-CORREA et al., 2006) e Paraná (LUNARDI et al., 2009; HALFEN; RIET-CORREA, 2007). Acredita-se que o BoHV-5 seja enzootico em todo o país (SOUZA et al., 2002).

Segundo Thiry et al. (2006) uma das explicações para a baixa incidência em países europeus e norte americanos é a de que a imunidade contra o BoHV-1 nestes países, seja por infecção natural ou por vacinação, protegeria os animais contra o BoHV-5 uma vez que ocorre reação cruzada entre eles, tornando assim os surtos mais frequentes em regiões onde a infecção natural e/ou vacinação contra o BoHV-1 ocorrem com menor frequência.

A meningoencefalite herpética ocasionada pelo BoHV-5 afeta principalmente animais jovens com até oito meses de idade submetidos a situações de estresse como o desmame

(COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2006; RISSI et al., 2007; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010) embora possa afetar animais adultos (SALVADOR et al., 1998), podendo ocorrer na forma de surtos ou casos isolados (ELIAS et al., 2004; PAULA et al., 2005). É uma doença geralmente esporádica e fatal, ao contrário do BoHV-1, que é endêmica e apresenta baixas taxas de mortalidade (SILVA et al., 1998). A enfermidade causada pelo BoHV-5 apresenta taxas de morbidade que variam de 0,5 % a 5 % e letalidade quase sempre de 100% (RISSI et al., 2007).

Studdert em 1989 chegou a mencionar a adaptação do BoHV-5 a raças zebuínas (*Bos indicus*) e indicar as raças europeias como menos adaptadas o que favorece a ocorrência da doença fatal mediante a transmissão ocasional, no entanto, no Brasil são descritos surtos de meningoencefalite por BoHV-5 em rebanhos tanto de raças zebuínas quanto europeias criados em sistemas semi-intensivo e extensivo ocorrendo raramente em animais confinados (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; ELIAS; SCHILD; RIET-CORREA, 2004). No entanto, surtos ocorridos em raças zebuínas com índices de mortalidade e letalidade tão elevados quanto os relatados em rebanhos de raças europeias (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002), contradizem a afirmação de Studdert (1989). Até o presente momento não há correlação entre a ocorrência do BoHV-5 ao tipo de criação e quanto ao caráter sazonal.

O período dos sinais é de três a quinze dias, com maioria das mortes ocorrendo entre um a seis dias (ELIAS; SCHILD; RIET-CORREA, 2004; BARROS et al., 2006).

## **2.10 PROFILAXIA**

A prevenção e controle da infecção ao BoHV-1 são baseadas no manejo da fazenda, na severidade e prevalência da infecção no rebanho, podendo incluir medidas sanitárias, calendários de vacinação e remoção dos animais infectados. Recomenda-se o uso de períodos de quarentena aos animais recém-introduzidos no rebanho, se o animal provém de fazendas com casos de BoHV-1; deve-se permitir a entrada apenas dos animais soronegativos. A monta natural deve ser evitada e deve-se preconizar o uso de partidas de sêmen negativas ao BoHV. As vacinas geralmente evitam o desenvolvimento de sinais clínicos e reduzem significativamente a eliminação do vírus após a infecção, mas não impedem completamente a infecção. Várias campanhas de erradicação foram realizadas ou estão atualmente em execução em diferentes países, incluindo programas de diagnóstico e remoção dos sororeagentes (OIE, 2012).

Várias vacinas estão disponíveis atualmente no mercado, sendo elas vacinas atenuadas que são administradas intranasal ou por via intramuscular, ou vacinas inativadas com altos níveis de vírus inativado ou porções da partícula viral (glicoproteínas), suplementado com um adjuvante para estimular a resposta imune, sendo administradas por via intramuscular ou subcutânea principalmente em fêmeas prenhes pelo fato de as vacinas vivas representarem um risco potencial ao feto (FRANCO; ROEHE, 2007).

Em países europeus programas de erradicação foram baseados na utilização de vacinação com vacinas marcadas ou vacinas com marcadores inativados que são baseados na deleção da gE, permitem a diferenciação de animais infectados de vacinados, em países com alta prevalência de animais infectados com vírus a campo, permitindo assim a eliminação do mesmo do rebanho. Os animais vacinados com marcadores deletados, ao serem testados através de um teste imunoenzimático específico que detecta anticorpos contra a glicoproteína deletada, não reagem ao teste, permitindo a distinção com os animais infectados com o vírus a campo, pois estes reagem positivamente ao teste; sendo assim permite a tomada de decisões, como a eliminação do animal (OIE, 2012; FRANCO; ROEHE, 2007).

## **2.11 DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico presuntivo da infecção por BoHV é efetuado com base nos sinais clínicos, nas lesões encontradas no exame clínico e no histórico da propriedade. Nos casos de meningoencefalite herpética bovina é possível observar durante a necropsia regiões de hiperemia das leptomeninges, tumefação das porções rostrais do telencéfalo e malacia (áreas de necrose com amolecimento do tecido nervoso); são observadas lesões microscópicas como meningoencefalite não purulenta (MENP) e necrosante, infiltrado inflamatório perivascular constituído de linfócitos e plasmócitos, e com menor frequência de neutrófilos, vasculite, gliose focal e difusa, o tecido necrótico pode aparecer infiltrado por células “gitter” (macrófagos que fagocitam e retiram o tecido necrótico) (RISSI et al., 2006; BARROS et al., 2006).

As lesões histopatológicas de MENP são sugestivas a infecção, no entanto o diagnóstico laboratorial deve ser utilizado na confirmação da suspeita de infecção por BoHV, utilizando-se técnicas como o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto (DEL FAVA et al., 2006) e a vírus neutralização, considerada a técnica padrão para a detecção de anticorpos específicos para o BoHV (VIEIRA et al., 2003; ROCHA et al., 2001), para isto realiza-se a prova com sorologia pareada: a primeira durante a fase aguda e a segunda três a quatro

semanas depois. Um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos entre as duas colheitas é indicativo da infecção e pode confirmar o diagnóstico. A soroconversão pode ser um indicativo de reativação do vírus latente no organismo, pois com a reativação viral o sistema imune sofre uma nova estimulação elevando o título de anticorpos (FLORES; CARGNELUTTI, 2012). No entanto, nem sempre é possível distinguir a infecção ocorrida pelo BoHV-1 ou pelo BoHV-5, devido a reação cruzada existente entre eles (PEDRAZA-ORDOÑEZ et al., 2013).

Outro ensaio confirmatório da infecção utilizado são métodos de diagnósticos direto onde podem ser utilizadas amostras como secreções nasais, oculares ou genitais, sêmen, fragmentos de órgãos frescos ou congelados; nos casos de diagnóstico para o BoHV-5 as amostras para a detecção viral *ante-mortem* são as secreções nasais e no *post-mortem* o SNC (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Estas amostras podem ser submetidas à técnica clássica como isolamento viral em cultura de células é o principal método de diagnóstico da infecção por BoHV-1 e BoHV-5 (SCHYNTS et al., 1999), porém, esta técnica não diferencia os dois tipos de vírus e não é uma técnica rápida para distinção entre eles (MAIDANA et al., 2013), pois consiste em submeter a amostra a pelo menos três passagens consecutivas em linhagens celulares até que se observe o efeito citopático (ECP), que são alterações na estrutura celular provocadas pela infecção viral. Em geral o BoHV-1 e 5 causam ECP visível em 24 a 72 horas após a inoculação; em casos de baixa concentração de vírus no material original, é necessário fazer as demais passagens. Ao final da terceira passagem, caso não haja evidência do ECP, o material é considerado negativo para o vírus (FRANCO; ROEHE, 2007). Se houver ECP compatível com BoHV, a identidade do agente deve ser confirmada; muitos ensaios tem sido utilizados para diferenciar o BoHV-1 e 5, incluem imunoenaios (imunofluorescência ou imunoperoxidase), utilizando-se anticorpos monoclonais ou conjugados apropriados.

Diversos protocolos de PCR que utilizam oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para genes específicos de cada vírus têm sido desenvolvidos (ROS et al., 1999a; ALEGRE; NANNI; FONDEVILA, 2001). Além disso, a técnica de PCR, aliada ao uso de análise de restrição enzimática, tem sido amplamente utilizada como instrumento para diagnóstico, bem como na caracterização dos isolados de BoHV, devido à estabilidade do genoma destes vírus (ROS; BELÁK, 1999b). São utilizadas também *nested* PCR, PCR *multiplex*, qPCR e qPCR *multiplex* (MAIDANA et al., 2013; DIALLO; CORNEY; RODWELL, 2011).

A PCR também é cada vez mais utilizada na rotina de diagnóstico, comparada com o isolamento viral, tem a vantagem de ser mais sensível e mais rápida, podendo ser realizada em um a dois dias, possibilitando a detecção de DNA epissomal de vírus não replicante em gânglios sensoriais, tal como o gânglio trigeminal, na fase de latência da infecção. A desvantagem é que as análises de PCR e principalmente da *nested* PCR são propensas a

contaminações e, portanto, têm de se tomar precauções para evitar resultados falsos positivos. O risco de contaminação é acentuadamente reduzido ao utilizar técnicas como a PCR em tempo real ou qPCR (OIE, 2012).

A PCR em tempo real difere da PCR convencional, pois o produto de PCR é detectado diretamente durante o ciclo de amplificação, utilizando sondas de hibridação marcadas com fluoróforos, o que aumenta a especificidade do ensaio. A PCR em tempo real possui algumas vantagens como a capacidade de fornecer sensibilidade próxima ou igual a métodos como a *nested* PCR com um risco muito menor de contaminações, a possibilidade de realizar uma análise quantitativa da carga viral (OIE, 2012; BUSTIN et al., 2009; ABRIL et al., 2004).

### 3. OBJETIVOS

- 1) Padronizar a qPCR *multiplex*, sistema Taqman, para o diagnóstico do BoHV-1 e 5, baseado na amplificação do gene UL30.
- 2) Avaliar a sensibilidade da qPCR *multiplex*.
- 3) Definir a ocorrência do BoHV-1 e 5 em amostras clínicas de sistema nervoso central (SNC) de bovinos.
- 4) Comparar os resultados obtidos na qPCR *multiplex* com a *nested* PCR convencional que amplifica a região da gB e gG; para o BoHV-1 e 5 respectivamente.
- 5) Fornecer subsídios às autoridades sanitárias para a tomada de decisões relacionadas ao PNCRH do MAPA através de levantamento epidemiológico realizado com as informações registradas no Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica – FORM SN.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas 268 amostras clínicas de SNC de bovinos com quadro neurológico, enviadas ao Laboratório de Vírus de Bovídeos / Centro de Pesquisa e

Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, por veterinários oficiais e autônomos, no período de janeiro de 2012 a janeiro de 2014, provenientes de diversas fazendas distribuídas nos estados brasileiros.

Estas amostras fazem parte do PNCRH, sendo inicialmente analisadas para o diagnóstico de raiva pela imunofluorescência direta e prova biológica (inoculação intracerebral em camundongos) (BRASIL, 2009). Todas as amostras negativas para estas duas provas foram fracionadas e submetidas ao diagnóstico diferencial de encefalites e encefalopatias, por meio de histopatologia, isolamento viral e técnicas de biologia molecular para o diagnóstico diferencial de BoHV-1 e 5 pelos métodos de *nested* PCR convencional e qPCR *multiplex*.

Foram avaliados aspectos epidemiológicos como raça, sexo, idade dos animais, duração do quadro clínico e sinais clínicos. Estes dados foram obtidos do Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (Anexo A), preenchido e enviado por veterinários oficiais ou particulares, estes dados foram compilados e analisados no software de planilhas Excel da Microsoft Office®.

Este trabalho atende os princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA – IB), registrado sob nº 55/08, renovado em 22 de agosto de 2012 (Anexo D).

#### **4.1.1 Histopatologia**

Amostras de SNC fixadas em formalina 10% tamponada foram cortadas em fragmentos menores e submetidos a exames histopatológicos, segundo recomendação do MAPA para diagnóstico diferencial de encefalites e EEB (BARROS; MARQUES, 2003). Os fragmentos de SNC foram submetidos a um protocolo de desidratação utilizando soluções de álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 95% e absoluto), diafanização pelo xilol e embebição em parafina (PROPHET et al., 1992), utilizando equipamento histotécnico Leica® TP 1020. Os fragmentos foram emblocados em inclusora de parafina Leica® modelo EG 1160, e os cassetes histológicos foram identificados em impressora Leica® modelo IP C.

O tecido emblocado em parafina foi cortado em micrótomo Leica® modelo RM 2255, a 4 µm de espessura estendido em banho-maria (63°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com albumina, para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina.

Em seguida, a lâmina foi colocada em estufa 65°C para prévia desparafinização e submetida a um protocolo de desparafinização (xilol), lavagem em álcool etílico absoluto, hidratação em soluções decrescentes de álcool etílico 95%, 80% e 70%, coloração pela HE, desidratação em soluções crescentes de álcool etílico 70%, 80%, 90% e absoluto, e diafanização em xilol (PROPHET et al., 1992). Para a montagem da lâmina e lamínula foi empregada a resina sintética Entellan (Merck®). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum (Leica® DM 2000) e fotos capturadas pelo sistema de imagem Leica® LAS.

#### **4.1.2 Isolamento viral**

Foi preparada uma suspensão a 1:5 (p/v) de material encefálico em meio MEM (E) modificado (Cultilab®, cat nº 1545) macerado em areia estéril, permaneceu em repouso à temperatura entre 4-8°C por uma hora, para ação do antibiótico presente no meio MEM, em seguida, a amostra foi estocada a -80°C até o momento da utilização. Sendo assim centrifugada a 2000 x g a 4°C por 20 minutos (Hettich® – modelo Universal 320R), o sobrenadante foi recolhido e inoculado em cultivo celular.

Para isolamento do vírus BoHV foi utilizada a linhagem celular “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK), adquiridas do “American Type Culture Collection” (ATCC), cultivada em placas de 24 cavidades (TPP – Techno Plastic Products®), na concentração de  $2 \times 10^5$  células por mL com meio MEM (E) modificado (Cultilab®, cat nº 1545), suplementado a 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®, cat nº 63). Decorrido 24 horas, quando a monocamada se mostrar confluenta, o meio de MEM da placa foi desprezado e inoculou-se 0,2 mL da suspensão em placas de 24 cavidades (TPP – Techno Plastic Products®). Após o período de adsorção de 1 hora, o inóculo foi descartado, as células foram lavadas com solução salina tamponada (PBS pH 7,2) e foi adicionado 1 mL de meio MEM (E) modificado (Cultilab®, cat nº 1545), com 5% de SFB e colocadas em incubadora (Thermo Electron Corporation® – modelo 3110) com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante sete dias. Leituras diárias foram realizadas para visualização de ECP. Para cada amostra foram realizadas três passagens seriadas, com intervalo de sete dias cada, as amostras que apresentaram ECP foram colhidas e submetidas a PCR para identificação viral.

### 4.1.3 Controles: positivo e negativo

Foram utilizados como controle positivo para o BoHV-1 a cepa de referência Los Angeles, gentilmente cedida pelo Instituto Robert Koch – Alemanha, mantida em cultura de células da linhagem de epitélio bovino MDBK. Utilizou-se o vírus com título viral de  $10^{5,8}$  DICT<sub>50</sub>/mL (dose infecciosa 50% para cultura de tecidos) 8ª passagem MDBK e para o BoHV-5 adotou-se como controle positivo um material isolado no Laboratório de Viroses de Bovídeos (LVB), número de identificação ISO02 292, caracterizado como BoHV-5 através da técnica de PCR convencional, mantida em cultivo celular 7ª MDBK com título viral de  $10^{7,8}$  DICT<sub>50</sub>/mL. Como controle negativo, utilizou-se amostra clínica previamente diagnosticada como negativa por isolamento em cultivo celular e por PCR convencional para ambos os agentes.

#### 4.1.3.1 Cultura celular e manutenção dos controles positivos

Para manutenção dos controles positivos, as amostras foram inoculadas em células MDBK; mantidas em garrafas de poliestireno especialmente desenvolvidas para cultivo celular (TPP – Techno Plastic Products®) com meio MEM (E) modificado (Cultilab®, cat nº 1545) e acrescido de 10% de SFB (Cultilab®, cat nº 63) em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% à temperatura de 37°C (Thermo Electron Corporation® – modelo 3110). Para a manutenção do cultivo, utilizou-se Tripsina Versene (Sigma-Aldrich®, cat nº 85450C) e o repique da linhagem MDBK, foi realizado entre três e cinco dias, a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

Para a manutenção dos controles positivos inoculou-se a cepa de BoHV-1 e o isolado de BoHV-5 em uma garrafa de poliestireno com a monocamada de células MDBK pré formada, preparada com 24 horas de antecedência, no momento da inoculação o meio MEM da garrafa suplementado com 10% SFB foi removido e o inoculo foi mantido por uma hora em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para adsorção viral nas células; após a incubação acrescentou-se um novo meio de manutenção, meio MEM acrescido de 5% SFB e mantido na incubadora nas mesmas condições.

Realizou-se leituras diárias para a observação do ECP na monocamada celular. Ao atingir-se cerca de 90%, a garrafa foi congelada e o sobrenadante centrifugado a 3000 x g por 20 minutos a 4°C (Hettich® – modelo Universal 320R). Após a centrifugação, a

suspensão viral foi distribuída em frações de um mL em tubos de criogenia (Corning®), sendo devidamente identificados com o nome do agente, passagem viral, data e o tempo que levou para ocasionar os 90% de ECP; em seguida armazenados em nitrogênio líquido a -196°C até a sua utilização.

#### 4.1.3.2 Titulação Viral

A determinação do título viral das frações utilizadas foi realizada em diluições seriadas na razão dez ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em meio MEM (E) modificado. A seguir foi distribuído 50 µL de cada diluição em oito repetições em microplaca de fundo chato de 96 poços (TPP – Techno Plastic Products®) e em seguida adicionado 50 µL de suspensão celular a uma concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL, sendo mantida em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Decorrido 96 horas após a incubação foi realizada a leitura da placa em microscópio invertido e o cálculo do título viral foi realizado pelo método de Reed & Muench (1938).

## 4.2 DETECÇÃO DO BoHV-1 E 5 POR PCR

O diagnóstico diferencial de encefalites para a detecção do BoHV-1 e 5 das amostras clínicas foi realizado através da técnica de *nested* PCR convencional e qPCR *multiplex*.

### 4.2.1 Extração DNA

As amostras clínicas de SNC e controles do BoHV-1 e 5 foram extraídas em câmara de segurança classe II tipo B2 (Veco®, modelo Biosafe Plus 12) pelo método do TRIzol® Reagent (Ambion®, cat. nº 15596-018) submetidas a um pré processamento; utilizou-se 250 µL da suspensão viral dos controles e adicionado 750 µL de TRIzol®, em seguida foi agitado em vórtex por 20 segundos e incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente.

Selecionou-se cerca de 50 a 100 mg de tecido, de diversas regiões do SNC, foram maceradas em 1,0 mL de TRIzol® com auxílio de pistilo e cadinho sendo assim transferida para um microtubo de polipropileno de 1,5 mL (Axygen®) previamente identificado e submetidas a incubação de 05 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, o procedimento foi o mesmo para os controles e as amostras clínicas, adicionando-se 200 µL de clorofórmio (Merck®, cat. nº 1.02445.1000) e agitou-se em vórtex (Daigger Vortex Genie®, modelo G-560) por 30 segundos, submetidas a uma nova incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas (centrífuga refrigerada Eppendorf®, modelo 5417R) a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, ao término da centrifugação descartou-se a fase aquosa superior (RNA) e no volume remanescente adicionou 300 µL de etanol absoluto (Merck®, cat. nº 1.00983.1000).

As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 05 minutos a 2.000 x g e descartou com auxílio de uma pipeta todo o volume mantendo apenas o pellet, que foi lavado com solução de citrato de sódio 0,1 M (Synth®, cat. nº C1033.01.AH) em etanol 10%, incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente, durante a incubação o tubo foi invertido ocasionalmente.

Decorrido o intervalo de incubação a amostra foi submetida à nova centrifugação e o procedimento de lavagem com citrato de sódio 0,1 M em etanol 10% foi repetido. Após a centrifugação adicionou 1,0 mL de etanol 75%, mantendo por 10 minutos à temperatura ambiente em repouso, em seguida centrifugou-se por 5 minutos a 2.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos até a evaporação do etanol. Por fim eluiu-se o DNA extraído em 150 µL de solução hidróxido de sódio (Merck®, cat nº 1.06498.1000) a 8 milimolar e 50 µL de tampão HEPES (Sigma-Aldrich®, cat. nº H3784). Nas amostras em que se observou material insolúvel foi submetido a uma nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, transferindo o sobrenadante contendo o DNA a um novo tubo previamente identificado. O DNA ficou estocado a -20°C até o uso.

#### **4.2.2 Garantia da qualidade do DNA extraído (Controle endógeno)**

##### **4.2.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)**

Para garantir que o DNA total foi devidamente extraído da amostra, utilizou-se uma PCR em tempo real com detecção da região do gene 16SrRNA do DNA mitocondrial de mamíferos, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram selecionados de acordo com a descrição de Cawthraw et al. (2009) (Quadro 1), optou-se pela detecção através do sistema SYBR *Green*, sendo assim o resultado obtido para este teste deve-se obrigatoriamente ser

positivo, caso contrário a amostra deve ser re-extraída, evitando assim um resultado falso negativo para o agente a ser detectado posteriormente.

**Quadro 1 – Sequência dos *primers* utilizados na validação da qualidade do DNA extraído, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado.**

Nome do <i>primer</i>	Referência	Sequência Localização no Genoma (pb)	Gene e tamanho do fragmento esperado
Mitgen Senso	CAWTHRAW et al., 2009	AGGGATAACAGCGCAATC 3704 a 3721	16SrRNA do DNA mitocondrial de mamíferos 119 pb
Mitgen Antisenso	CAWTHRAW et al., 2009	ATCGTTGAACAAACGAACC 3804 a 3822	

#### 4.2.2.2 Concentração dos reagentes

As amostras foram amplificadas no equipamento da Roche Light Cycler® 480 II, utilizou-se o reagente SYBR *Green I* Master (Roche®, cat. nº 04 707 516 001), a uma concentração final de 1X, *primers* a 0,8 µM cada, completou-se o volume final de 20 µL com água livre de nucleases; aplicou-se 05 µL de DNA extraído, representado no Quadro 2.

**Quadro 2 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de validação da qualidade de DNA extraído (controle endógeno).**

Reagentes	Vol. para uma amostra (µL)	[ ] final
SYBR <i>Green I</i> Master	10	1X
<i>Primer</i> mitgen senso a 20pmol	0,8	0,8 µM
<i>Primer</i> mitgen antisenso a 20pmol	0,8	0,8 µM
Água livre de nucleases	3,4	---
DNA	05	
Volume total	20	

#### 4.2.2.3 Parâmetros de ciclagem PCR em tempo real sistema SYBR *Green*

Utilizou-se uma etapa de pré-incubação a 95°C por 5 minutos, a amplificação foi seguida de 45 ciclos a 95°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 06 segundos, em seguida o ciclo de dissociação (*melting*) utilizado foi de 95°C por 05 segundos, 65°C por 01 minuto e 97°C com uma aquisição contínua, seguida de resfriamento a 40°C por 10 segundos, como representado no Quadro 3.

**Quadro 3 – Parâmetros de ciclagem da PCR em tempo real para a validação da qualidade de DNA extraído (controle endógeno)**

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	TAXA DE RAMPAGEM (AQUISIÇÃO POR °C)	CICLOS
PRÉ-INCUBAÇÃO	95	00:05:00	4,40	1
AMPLIFICAÇÃO	95	00:00:10	4,40	45
	50	00:00:20	2,00	
	72	00:00:06	4,40	
CURVA DE DISSOCIAÇÃO ( <i>MELTING</i> )	95	00:00:05	4,40	1
	65	00:01:00	2,20	
	97	contínuo	0,11	
RESFRIAMENTO	40	00:00:10	2,00	1

As amostras positivas para a amplificação do gene 16SrRNA do DNA mitocondrial de mamíferos, foram então submetidas à *nested* PCR convencional e qPCR *multiplex*.

#### 4.2.3 *Nested* PCR convencional para detecção do BoHV-1 e 5

##### 4.2.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

A detecção do BoHV-1 e 5 realizada através da *nested* PCR convencional utilizou os *primers* que codificam a glicoproteína B e G, respectivamente; as sequências foram analisadas no BLAST e obtiveram 100% de identidade com seus respectivos agentes,

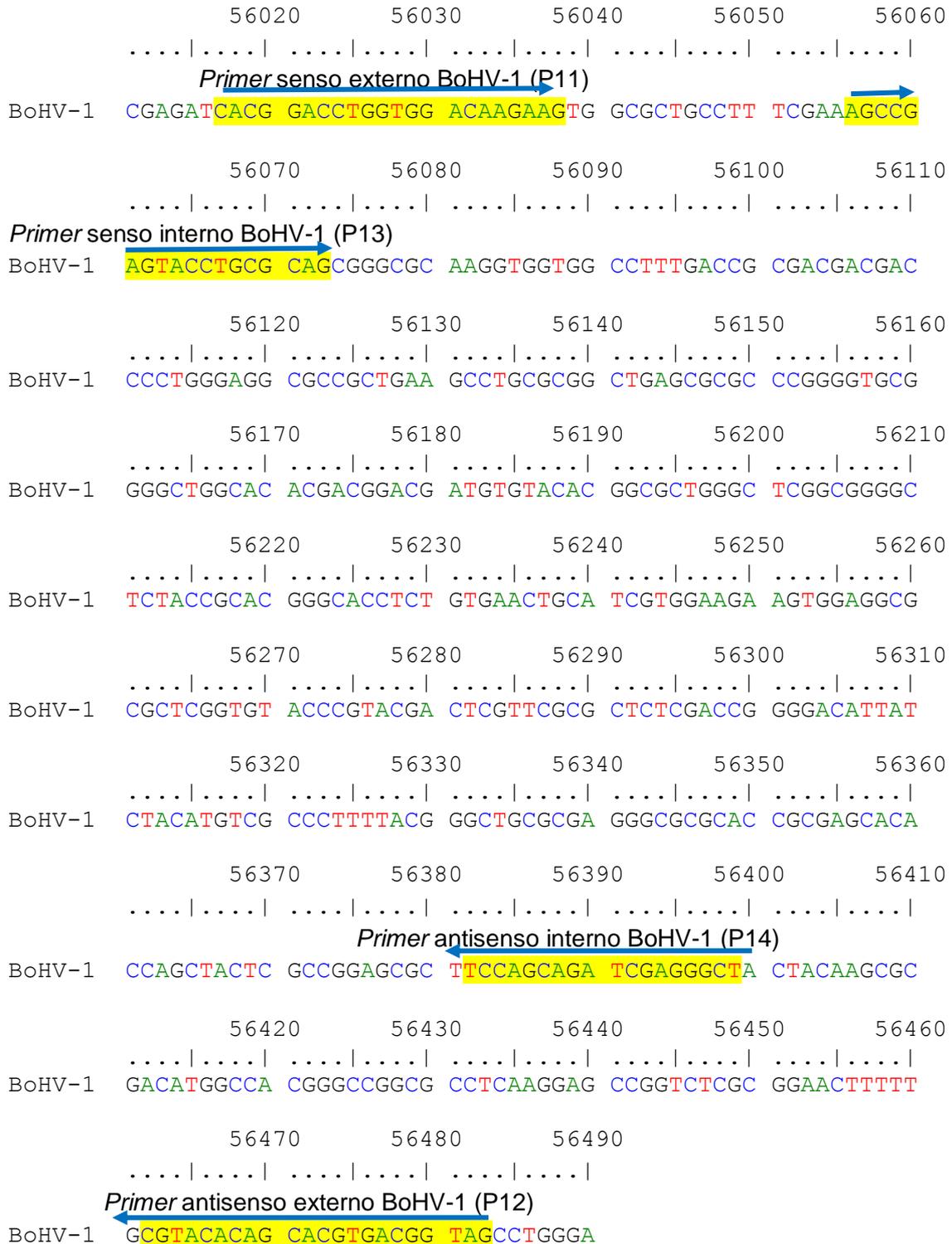
BoHV-1 e 5, a sequência dos *primers* estão representados nos Quadros 4 e 5. As amostras foram primeiramente amplificadas com os *primers* externos (1ª amplificação) de cada agente e em seguida o produto amplificado desta PCR foi submetido a uma nova amplificação com *primers* internos (2ª amplificação). As localizações destes *primers* no genoma estão representadas nas Figuras 3 e 4, os *primers* do BoHV-1 foram alinhados com a estirpe de referência do Herpesvírus Bovino tipo 1.1, cujo número de acesso é GenBank AJ004801.1 e o BoHV-5 com a estirpe SV507/99, número de acesso GenBank AY261359.1.

**Quadro 4 - Sequência de *primers* da *nested* PCR para o BoHV-1, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1).**

Nome do <i>primer</i>	Referência	Sequência Localização no Genoma (pb)	Gene e tamanho do fragmento
P11 1ª amplificação	ROCHA et al., 1998	5' CACGGACCTGGTGGACAAGAAG 3' 56017 – 56038	gB 467 pb
P12 1ª amplificação	ROCHA et al., 1998	5' CTACCGTCACGTGCTGTGTACG 3' 56462 – 56483	
P13 2ª amplificação	ROCHA et al., 1998	5' AGCCGAGTACCTGCGCAG 3' 56056 – 56073	gB 344 pb
P14 2ª amplificação	ROCHA et al., 1998	5' AGCCCTCGATCTGCTGGA 3' 56382 – 56399	

**Quadro 5 - Sequência de *primers* da *nested* PCR para o BoHV-5, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado, número de acesso GenBank AY261359.1 (estirpe de referência SV507/99).**

Nome do <i>primer</i>	Referência	Sequência Localização no Genoma (pb)	Gene e tamanho do fragmento
P52 1ª amplificação	GOMES et al., 2003	5' CCGGCGATTACGAGGACGAG 3' 120312 – 120331	gG 593 pb
P53 1ª amplificação	GOMES et al., 2003	5' TGCGGGCAGACGCGGGCGCG 3' 120885 – 120904	
P54 2ª amplificação	GOMES et al., 2003	5' TACGGACTGCCGGATTAACA 3' 120376 – 120395	gG 222 pb
P55 2ª amplificação	GOMES et al., 2003	5' GTCACCACTACCACCGCCGCCAACAT 3' 120572 – 120597	



**Figura 3 – Localização dos primers externos e internos no genoma para detecção do BoHV-1, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1).**

```

      120320      120330      120340      120350      120360
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      Primer senso externo BoHV-5 (P52)
BoHV-5  ACCGGCGATT ACGAGGACGA GGACGGGAGC GCTAGCGGGG ACCCGCAGGA

      120370      120380      120390      120400      120410
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      Primer senso interno BoHV-5 (P54)
BoHV-5  AAAAGACCCC GATCTTACGG ACTGCCGGAT TAACAGGCTC TTCGACGAGA

      120420      120430      120440      120450      120460
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  GCGACATGTT CCGGAACGCC AGCGGGCCCG ACTCGCTGCT AATCGGCGCC

      120470      120480      120490      120500      120510
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  GTCGCCAAGG GCATCTTGAC CATGCCCTT GGCCTGCCGG CCGGCCGCTC

      120520      120530      120540      120550      120560
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  TTACGAGGCC CTGCGGAACG CCTCGCTGGA GTGCAACGCC CGCATGCGCG

      120570      120580      120590      120600      120610
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      Primer antiseno interno BoHV-5 (P55)
BoHV-5  AGACCGGCGA GATGTTGGCG GCGGTGGTAG TGGTGACGCC ACCACCGCCC

      120620      120630      120640      120650      120660
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  CAGAAGTCCG CCCGCTCCGA GCGCCGCTCC GATTCCCGGG CAACCGACTC

      120670      120680      120690      120700      120710
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  GGATTTTGGG CTCTTTGGCT TGCCCACTGA TCCCGCCACG CGGCGCGCCA

      120720      120730      120740      120750      120760
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  TCCTCATCGG CCTCGCATC GCTTTGCTAG TGCTGCTGTT CTCGCTGGTT

      120770      120780      120790      120800      120810
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  ATTGTGATCA TCTGCGCTTG CCAGCTCGCC CGCAAGGCCA CCGCCGAACG

      120820      120830      120840      120850      120860
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
BoHV-5  GCGGGCCCGC GCCGCCAGT TTGCCAAGGA TAACCCTGCG TACGAGCCCA

      120870      120880      120890      120900      120910
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      Primer antiseno externo BoHV-5 (P53)
BoHV-5  TGCTCCGCGT CTAGGACCCC CCGGCGCGCC CGCGTCTGCC CGCAGTTTCC

```

**Figura 4 - Localização dos primers externos e internos no genoma para detecção do BoHV-5, número de acesso GenBank AY261359.1 (estirpe de referência SV507/99)**

## 4.2.3.2 Concentração dos reagentes

Para a 1ª amplificação das amostras utilizou-se a PCR Master Mix (Promega® – cat. nº M7502) a uma concentração final de 1 X, a concentração final de cada *primer* utilizado foi de 0,5 µM, completou-se o volume final de 25 µL com água livre de nucleases e aplicou-se 05 µL de DNA. O produto amplificado da 1ª amplificação foi submetido a uma nova amplificação utilizando a mesma concentração de reagentes, porém utilizou-se menor volume de DNA amplificado: 02 µL, representados pelo Quadro 6 concentração de reagentes para a detecção do BoHV-1 e Quadro 7 para o BoHV-5.

**Quadro 6 - Concentração dos reagentes utilizados na reação de *nested* PCR para BoHV-1.**

1ª amplificação			2ª amplificação		
Reagentes	Vol. para uma amostra (µL)	[ ] final	Reagentes	Vol. para uma amostra (µL)	[ ] final
PCR Master Mix	12,5	1X	PCR Master Mix	12,5	1X
<i>Primer</i> senso (P11) a 10 µM	1,25	0,5 µM	<i>Primer</i> senso (P13) a 10 µM	1,25	0,5 µM
<i>Primer</i> antisenso (P12) a 10 µM	1,25	0,5 µM	<i>Primer</i> antisenso (P14) a 10 µM	1,25	0,5 µM
Água livre de nucleases	05	---	Água livre de nucleases	08	---
DNA	05		Produto da 1ª amplificação	02	
Volume total	25		Volume total	25	

**Quadro 7 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de *nested* PCR para BoHV-5.**

1ª amplificação			2ª amplificação		
Reagentes	Vol. para uma amostra (µL)	[ ] final	Reagentes	Vol. para uma amostra (µL)	[ ] final
PCR Master Mix	12,5	1X	PCR Master Mix	12,5	1X
<i>Primer</i> senso (P52) a 10 µM	1,25	0,5 µM	<i>Primer</i> senso (P54) a 10 µM	1,25	0,5 µM
<i>Primer</i> antisenso (P53) a 10 µM	1,25	0,5 µM	<i>Primer</i> antisenso (P55) a 10 µM	1,25	0,5 µM
Água livre de nucleases	05	---	Água livre de nucleases	08	---
DNA	05		Produto da 1ª amplificação	02	
Volume total	25		Volume total	25	

#### 4.2.3.3 Parâmetros de ciclagem PCR convencional

As amostras foram amplificadas em termociclador (Eppendorf®, modelo Mastercycler gradient), utilizando uma desnaturação de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por um minuto, 56°C por um minuto, 72°C por um minuto e a uma extensão final de 72°C por 5 minutos, como representada no Quadro 8, para os dois agentes a serem detectados e nas duas ampliações.

**Quadro 8 - Parâmetros de ciclagem da *nested* PCR convencional para BoHV-1 e 5.**

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	CICLOS
DESNATURAÇÃO	95	00:05:00	1
AMPLIFICAÇÃO	95	00:01:00	35
	56	00:01:00	
	72	00:01:00	
EXTENSÃO FINAL	72	00:05:00	1
	10	INFINITO	

#### 4.2.4 Eletroforese

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Promega®, cat. nº V3125), o gel foi preparado em tampão Tris Borato EDTA – TBE (Promega®, cat. nº V4251) a 1X a uma concentração de 1,5%. Cada amostra foi então corada com 1,0 µL de gel *red* (Biotium®, cat. nº 41003) (diluído a 1:150 em água livre de nucleases) e 2,0 µL tampão de carregamento loading 6X (Thermo Scientific®, cat. nº #R0611), utilizou-se 1,0 µL do marcador molecular de 100 bp (Thermo Scientific®, cat. nº #SM0243) para auxiliar na interpretação do resultado, sendo corado com 1,0 µL do gel *red* diluído, a amostra foi então submetida a corrida eletroforética com auxílio de fonte de eletroforese (Bio rad®, modelo PowerPac Basic) a 100 Volts por uma hora, sendo visualizado então em transiluminador (Gel Doc-It™ Imaging System®) sob luz ultravioleta (320nm) e fotodocumentado com o auxílio do programa VisionWorksLS Software.

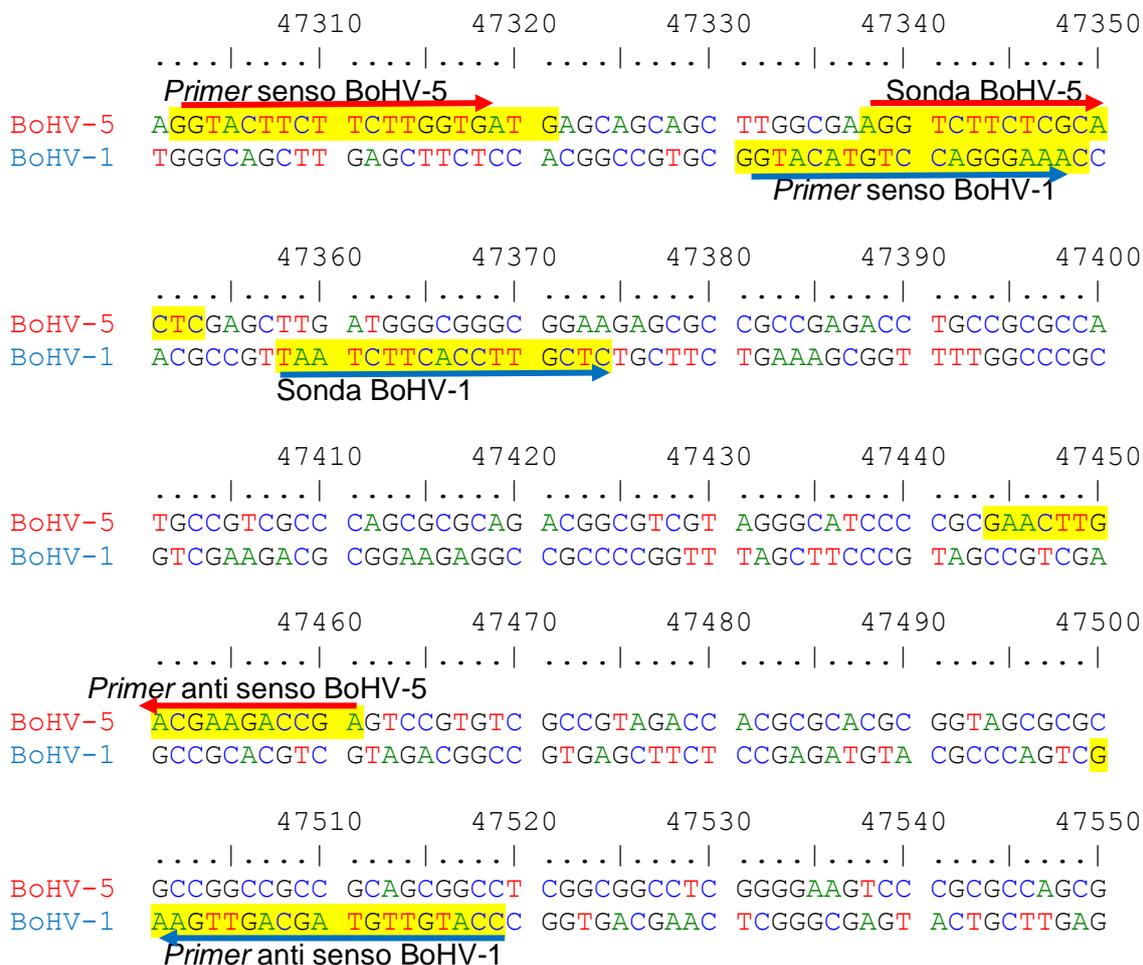
#### 4.2.5 PCR em tempo real quantitativa *multiplex*

##### 4.2.5.1 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sondas

A seleção dos *primers* e sondas e a padronização da qPCR *multiplex* foi feita de acordo com Diallo, Corney e Rodwell (2011), pertencentes ao gene da UL30, utilizou-se sondas marcadas com fluoróforos 6-FAM e VIC, respectivamente para a detecção do BoHV-1 e 5, permitindo assim o desenvolvimento de ensaios *multiplex*, a localização dos *primers* e sondas estão representados no Quadro 9 e na Figura 5.

**Quadro 9 - Sequência de *primers* e sondas da qPCR *multiplex*, localização no genoma, região do gene e tamanho do fragmento esperado, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1) e AY261359.1 (estirpe de referência SV507/99), respectivamente para o BoHV-1 e 5.**

Nome do <i>primer</i> e sonda	Sequência Localização no Genoma (pb)	Gene e tamanho do fragmento
BoHV-1 F	5' GGTACATGTCCAGGGAAAC 3' 47331 – 47349	UL30 189 pb
BoHV-1 R	5' CTACCGTCACGTGCTGTGTACG 3' 47500 – 47519	
BoHV-1 sonda	5' FAM TAATCTTCACCTTGCTC - MGB 3' 47358 – 47374	
BoHV-5 F	5' GGTACTTCTTCTTGGTGATG 3' 47302 – 47321	UL30 160 pb
BoHV-5 R	5' TCGGTCTTCGTCAAGTTC 3' 47444 – 47461	
BoHV-5 sonda	5' VIC AGGTCTTCTCGCACTC - MGB 3' 47338 – 47353	



**Figura 5 – Representação da localização dos primers e sondas utilizados na PCR em tempo real quantitativa para o BoHV-1 e 5 do gene UL-30, número de acesso GenBank AJ004801.1 (estirpe de referência Herpesvírus Bovino tipo 1.1) e AY261359.1 (estirpe de referência para o BoHV-5 SV507/99).**

#### 4.2.5.2 Curva padrão da qPCR

O DNA dos controles positivos utilizados neste experimento foi submetido a uma amplificação com seus respectivos primers da PCR em tempo real, o produto desta PCR foi então submetido a uma eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente, a banda visualizada no gel, foi então cortada e purificada para a construção da curva padrão. O produto amplificado foi purificado com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega<sup>®</sup>, cat. nº A9281), segundo recomendações do fabricante, sendo assim quantificado no equipamento QuantiFluor<sup>™</sup> (Promega<sup>®</sup>) e calculado o número de cópias de

DNA produzido para então submeter-se a diluição seriada e construção da curva padrão. O volume recuperado da purificação foi de 50  $\mu\text{L}$ , o material purificado foi mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Foram realizados três ensaios em três dias diferentes avaliando a reprodutibilidade para a construção da curva padrão, que foi realizada em triplicata e em cinco ensaios diferentes.

#### 4.2.5.3 Concentração dos reagentes

Os reagentes e a concentração final da PCR Master Mix (Promega<sup>®</sup> – cat. nº M7502) e dos *primers* utilizados para a amplificação do produto a ser purificado para a construção da curva padrão foram os mesmos que o da reação de *nested* PCR convencional. Porém, o volume final da reação foi de 50  $\mu\text{L}$ , como representado no Quadro 10.

**Quadro 10 - Concentração dos reagentes utilizados para a amplificação do produto a ser purificado para a construção da curva padrão**

Reagentes	Vol. para uma amostra ( $\mu\text{L}$ )	[ ] final
PCR Master Mix	25	1X
<i>Primer</i> senso a 10 $\mu\text{M}$	2,5	0,5 $\mu\text{M}$
<i>Primer</i> antisenso a 10 $\mu\text{M}$	2,5	0,5 $\mu\text{M}$
Água livre de nucleases	10	---
DNA	10	
Volume total	50	

#### 4.2.5.4 Parâmetros de ciclagem da PCR para obter-se o produto a ser purificado para construção da curva padrão

Os controles positivos do BoHV-1 e 5 utilizados no presente trabalho foram amplificadas em termociclador (Eppendorf<sup>®</sup>, modelo Mastercycler gradient), utilizando uma desnaturação de  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $52^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e a uma extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, como representada no Quadro 11.

**Quadro 11 - Parâmetros de ciclagem da PCR para obter-se o produto a ser purificado para construção da curva padrão**

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	CICLOS
DESNATURAÇÃO	95	00:05:00	1
AMPLIFICAÇÃO	95	00:00:30	30
	52	00:00:30	
	72	00:00:30	
EXTENSÃO FINAL	72	00:05:00	1
	10	INFINITO	

#### 4.2.5.5 Quantificação do produto purificado

A quantificação do produto purificado foi realizado no equipamento QuantiFluor™ (Promega®), utilizando o kit QuantiFluor™ dsDNA System (Promega®, cat. nº E2670), segundo recomendações do fabricante.

O valor obtido foi então submetido ao cálculo do número de cópias de DNA que foi calculado através da fórmula:

$$\text{Nº cópias DNA por } \mu\text{L} = \frac{\text{valor do produto quantificado (q/ } \mu\text{L)}}{\text{Tamanho do fragmento do produto da PCR X 660 daltons}} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Obtido o nº de cópias de DNA por  $\mu\text{L}$ , foram feitas diluições seriadas na base dez, com água livre de nucleases. A diluição seriada foi realizada da seguinte forma: 90  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases em 11 tubos nomeados de  $10^{10}$  a  $10^0$  e ao tubo  $10^{10}$  adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  do material purificado e quantificado.

A curva padrão foi estipulada a partir das menores diluições do BoHV-1 que foram submetidas à reação de PCR em tempo real quantitativa *monoplex* (qPCR *monoplex*), a ensaios com seus respectivos *primers* e sondas, verificando assim a sensibilidade analítica do BoHV-1 e em outra reação verificou-se a sensibilidade do BoHV-5; a concentração de reagentes utilizados e resultados obtidos na qPCR *monoplex* estão apresentados nos

Apêndice A a D. Determinada a sensibilidade para a qPCR *monoplex*, realizou-se a determinação da sensibilidade da qPCR *multiplex*, utilizando as seguintes concentrações.

#### 4.2.5.6 Concentração de reagentes para PCR em tempo real *multiplex*

A reação foi padronizada utilizando o reagente LightCycler® 480 Probes Master (Roche®, cat. nº. 04 707 494 001), a uma concentração final de 1X, *primers* a 0,8 µM cada, sondas a 0,2 µM e completou-se o volume final de 25 µL com água livre de nucleases; aplicou-se 6 µL de DNA extraído, representado no Quadro 12; todas as amostras foram testadas em triplicata.

**Quadro 12 - Concentração dos reagentes utilizados na qPCR *multiplex***

Reagentes	Volume para uma amostra (µL)	[ ] final
LightCycler® 480 Probes Master	12,5	1X
<i>Primer</i> senso BoHV-1 a 50 µM	0,4	0,8 µM
<i>Primer</i> antisenso BoHV-1 a 50 µM	0,4	0,8 µM
<i>Primer</i> senso BoHV-5 a 50 µM	0,4	0,8 µM
<i>Primer</i> antisenso BoHV-5 a 50 µM	0,4	0,8 µM
Sonda BoHV-1 a 10 µM	0,5	0,2 µM
Sonda BoHV-5 a 10 µM	0,5	0,2 µM
Água livre de nucleases	3,9	---
DNA	6,0	
Volume total	25	

#### 4.2.5.7 Parâmetros de ciclagem PCR em tempo real *multiplex*

As diluições da curva padrão e as amostras clínicas foram submetidas à amplificação, utilizou-se uma etapa de pré-incubação a 95°C por 10 minutos, a amplificação foi seguida de 50 ciclos a 95°C por 10 segundos, 60°C por 45 segundos com aquisição da

fluorescência nesta etapa, seguida de resfriamento a 40°C por 10 segundos, conforme representado no Quadro 13.

**Quadro 13 - Parâmetros de ciclagem da qPCR *multiplex***

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	TAXA DE RAMPAGEM (AQUISIÇÃO POR °C)	CICLOS
PRÉ-INCUBAÇÃO	95	00:10:00	4,4	1
AMPLIFICAÇÃO	95	00:00:10	4,4	50
	60	00:00:45	2,2	
RESFRIAMENTO	40	00:00:10	2,0	1

#### 4.2.5.8 Determinação da sensibilidade analítica qPCR *multiplex*

Para determinar a sensibilidade analítica da prova, que corresponde ao número mínimo de cópias detectáveis (limite de detecção: LOD); e a reprodutibilidade, as amostras diluídas foram testadas em triplicata e em cinco ensaios diferentes. Avaliando a eficiência e regressão linear e o “slope” das corridas, tendo em vista que para o equipamento utilizado a eficiência ideal é a mais próxima de 2,0 e o “slope” de -3,32.

#### 4.2.5.9 Especificidade analítica da PCR em tempo real

Para avaliar a especificidade analítica da qPCR *multiplex*, selecionou-se alguns agentes da mesma família que o BoHV-1 e 5 e agentes incluídos na lista de diagnóstico diferencial das encefalites por provocarem sintomatologia semelhante, foram testados então para o protozoário *Neospora caninum*, o herpesvírus bovino tipo 2, o herpesvírus equino e vírus da febre catarral maligna.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 GARANTIA DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO (CONTROLE ENDÓGENO)

Todas as amostras testadas para o gene 16SrRNA do DNA mitocondrial apresentaram resultado positivo, validando assim a extração da amostra clínica, permitindo assim dar continuidade ao diagnóstico.

Diallo, Corney e Rodwell (2011) utilizaram o sistema Taqman<sup>®</sup> para avaliar a qualidade do DNA extraído. Devido ao insucesso na padronização, o presente trabalho adotou o sistema SYBR Green. As amostras foram submetidas a este ensaio para certificar que o DNA foi devidamente extraído, descartando a possibilidade de uma extração inadequada ou insuficiente e até mesmo da presença de inibidores, evitando assim um resultado falso negativo.

Em cada ensaio utilizou-se um controle positivo (BoHV-1 ou BoHV-5) e um controle negativo (água livre de nucleases), foi considerado como resultado positivo: toda amostra que obteve um ciclo de quantificação (Cq) menor que 40 ciclos e a análise da curva de dissociação com a presença de um pico único, com temperatura de dissociação média de 80,36°C como podemos verificar na Figura 6. Para o resultado negativo é observado a não existência da dissociação do produto amplificado, com isso, não se observa a curva e o pico de dissociação.

O termo Cq foi proposto por Bustin et al. em 2009, o qual estabeleceu um guia com informações mínimas para publicação do experimento da qPCR, podendo ser referenciado nas literaturas também como *threshold cycle* (Ct), *crossing point* (Cp) ou *take-off point* (TOP).

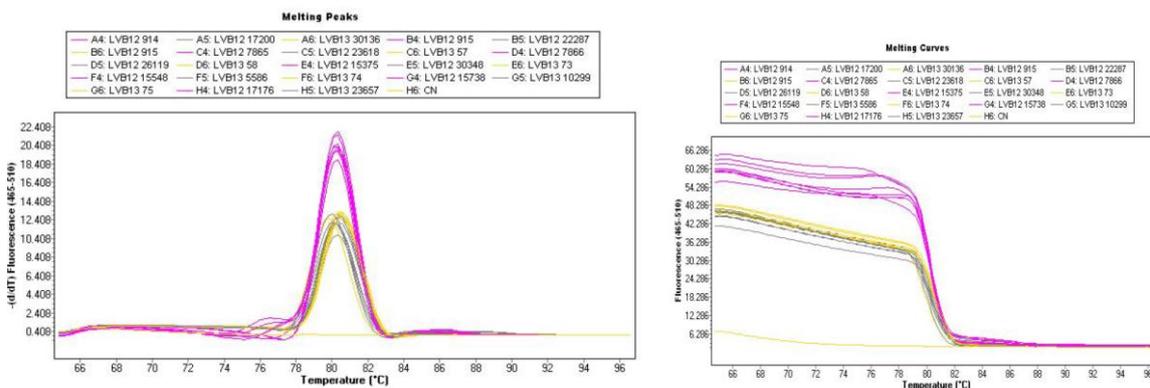
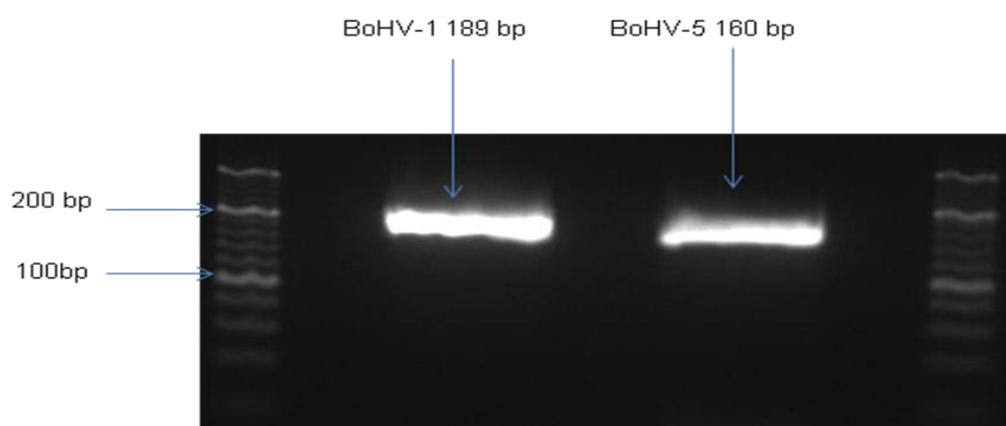


Figura 6 – Resultado da análise da garantia da qualidade do DNA extraído (controle endógeno), demonstrado amplificação das amostras com exceção do controle negativo.

## 5.2 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA CURVA PADRÃO

A construção da curva padrão foi realizada a partir da banda cortada do gel e purificada, o produto obtido da amplificação do gene da UL30 para o BoHV-1 foi de 189 pb e 160 pb para o BoHV-5 (Figura 7).



**Figura 7 - Produto obtido da amplificação do gene da UL30 para o BoHV-1 com 189 pb e 160 pb para o BoHV-5, para construção da curva padrão, peso molecular de 20 pb.**

Ao realizar a quantificação no equipamento QuantiFluor™ (Promega®), obteve-se o valor em nanogramas por  $\mu\text{L}$  ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e substituído na fórmula, obteve-se o número de cópias de DNA por  $\mu\text{L}$  representado no Quadro 14. Observaram-se valores diferentes entre os ensaios na quantificação, provavelmente ocorreu uma perda durante o procedimento de purificação, porém não interferindo no experimento, pois as diluições seriadas produzidas foram realizadas a partir do número de cópias de DNA por  $\mu\text{L}$  obtido.

**Quadro 14 – Representação dos ensaios, valor obtido na quantificação do produto purificado e valor correspondente em número de cópias de DNA por  $\mu\text{L}$ .**

Agente	Número do ensaio	Quantificação do produto purificado ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	Número de cópias de DNA por $\mu\text{L}$
BoHV-1	Ensaio nº 1	84,65	$4,09 \times 10^{11}$
	Ensaio nº 2	82,35	$3,98 \times 10^{11}$
	Ensaio nº 3	63,40	$3,06 \times 10^{11}$
BoHV-5	Ensaio nº 1	91,00	$5,19 \times 10^{11}$
	Ensaio nº 2	56,40	$3,22 \times 10^{11}$
	Ensaio nº 3	79,88	$4,56 \times 10^{11}$

### 5.3 SENSIBILIDADE ANALÍTICA: DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DA qPCR MULTIPLEX

A construção da curva padrão foi realizada baseada na concentração das menores diluições ( $10^0$  a  $10^6$  cópias de DNA por  $\mu\text{L}$ ) submetidas em triplicata e observou-se que o limite de detecção foi de  $10^1$  cópias de DNA por  $\mu\text{L}$  para ambos os agentes, por ser a menor diluição apresentando média Cq da triplicata para o BoHV-1 e 5, e uma vez que a diluição  $10^0$  não demonstrou repetibilidade nos ensaios; mesmo assim demonstrou sensibilidade semelhante ao trabalho de Diallo, Corney e Rodwell (2011) para o BoHV-1 e ser mais sensível para o BoHV-5 o qual detectou 45 cópias de DNA.

A eficiência obtida em todos os ensaios foram sempre próximas a 2,0 e o “slope” próximo a 3,32. Os resultados de média Cq na qPCR *multiplex* foram muito próximos aos da qPCR *monoplex* (dados apresentados nos Apêndices B a E), validando assim o teste. A diferença notada entre a qPCR *multiplex* e *monoplex* foi o perfil da curva de amplificação que demonstrou ser mais inclinada quando realizada na qPCR *multiplex* como demonstrado nas Figuras 8 e 9. Os valores de Cq e concentração de DNA obtidos em um dos ensaios de qPCR *multiplex* estão representados nos Quadros 15 e 16, respectivamente para o BoHV-1 e 5.

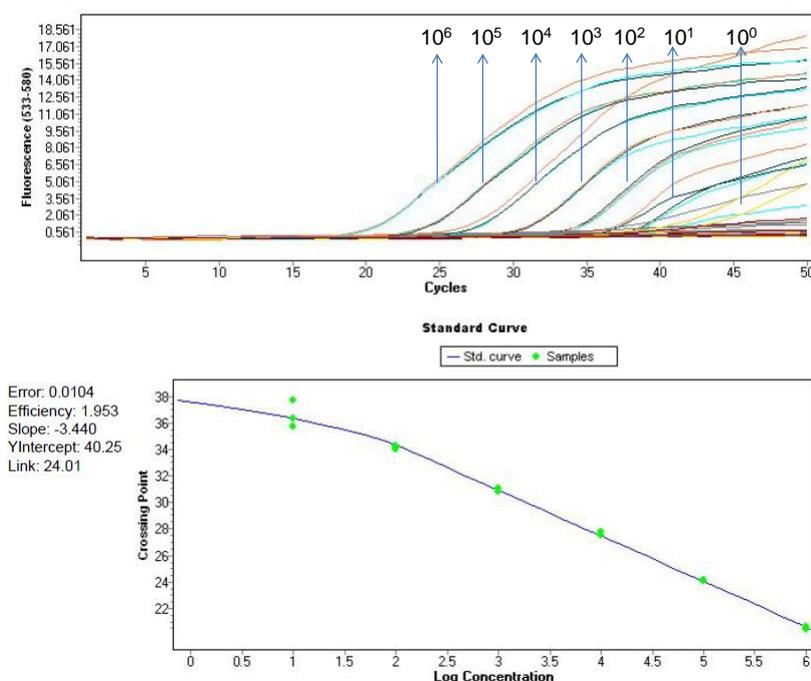
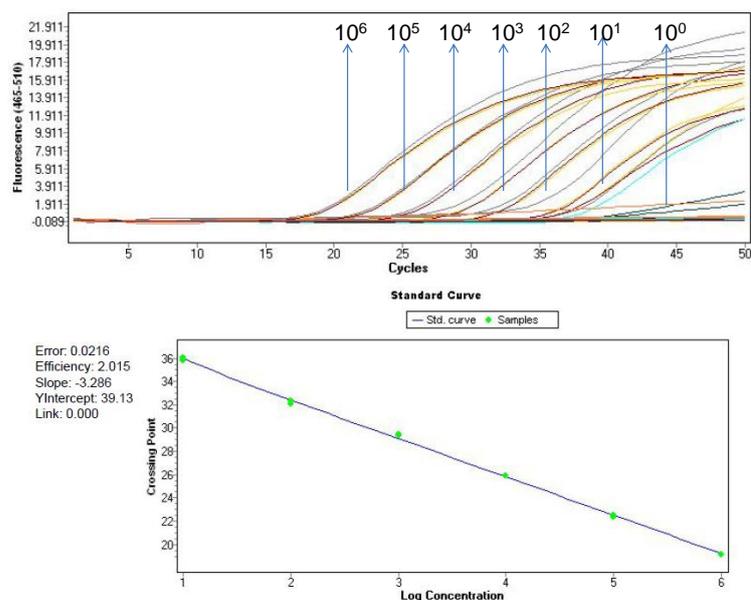


Figura 8 - Curva padrão do BoHV-1 produzida a partir de produto amplificado e purificado, no ensaio de qPCR *multiplex*. Valores da reação: erro: 0,0104; eficiência: 1,953; Slope: -3,440.



**Figura 9 - Curva padrão do BoHV-5 produzida a partir de produto amplificado e purificado, no ensaio de qPCR *multiplex*. Valores da reação: erro: 0,0216; eficiência: 2,015; Slope: -3,286.**

**Quadro 15 - Média Cq e média da concentração das diluições de BoHV-1, obtidas na qPCR *multiplex*.**

Cópias de DNA/ $\mu$ L	Média Cq	Média da Concentração
$10^0$	37,82	$3,45 \times 10^0$
$10^0$	37,31	$4,59 \times 10^0$
$10^0$	36,72	$6,42 \times 10^0$
$10^1$	35,82	$1,09 \times 10^1$
$10^1$	35,96	$1,00 \times 10^1$
$10^1$	36,04	$9,50 \times 10^0$
$10^2$	32,10	$1,21 \times 10^2$
$10^2$	32,32	$1,04 \times 10^2$
$10^2$	32,06	$1,25 \times 10^2$
$10^3$	29,34	$8,40 \times 10^2$
$10^3$	29,39	$8,13 \times 10^2$
$10^3$	29,46	$7,73 \times 10^2$
$10^4$	25,88	$9,52 \times 10^3$
$10^4$	25,90	$9,38 \times 10^3$
$10^4$	25,94	$9,13 \times 10^3$
$10^5$	22,36	$1,12 \times 10^5$
$10^5$	22,53	$9,91 \times 10^4$
$10^5$	22,51	$1,01 \times 10^5$
$10^6$	19,17	$1,05 \times 10^6$
$10^6$	19,13	$1,07 \times 10^6$
$10^6$	19,14	$1,07 \times 10^6$

**Quadro 16 - Média Cq e média da concentração das diluições de BoHV-5, obtidas na qPCR multiplex.**

Cópias de DNA/ $\mu$ L	Média Cq	Média da Concentração
$10^0$	NEGATIVO	NEGATIVO
$10^0$	38,30	$1,90 \times 10^{-1}$
$10^0$	37,57	$1,01 \times 10^0$
$10^1$	36,33	$1,00 \times 10^1$
$10^1$	37,71	$2,44 \times 10^1$
$10^1$	35,73	$2,40 \times 10^1$
$10^2$	34,21	$1,10 \times 10^2$
$10^2$	34,22	$1,09 \times 10^2$
$10^2$	33,98	$1,28 \times 10^2$
$10^3$	31,04	$9,12 \times 10^2$
$10^3$	30,76	$1,11 \times 10^3$
$10^3$	31,02	$9,27 \times 10^2$
$10^4$	27,77	$8,14 \times 10^3$
$10^4$	27,55	$9,47 \times 10^3$
$10^4$	27,53	$9,59 \times 10^3$
$10^5$	24,14	$9,24 \times 10^4$
$10^5$	24,03	$9,94 \times 10^4$
$10^5$	24,06	$9,80 \times 10^4$
$10^6$	20,50	$1,06 \times 10^6$
$10^6$	20,62	$9,76 \times 10^5$
$10^6$	20,43	$1,11 \times 10^6$

#### 5.4 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

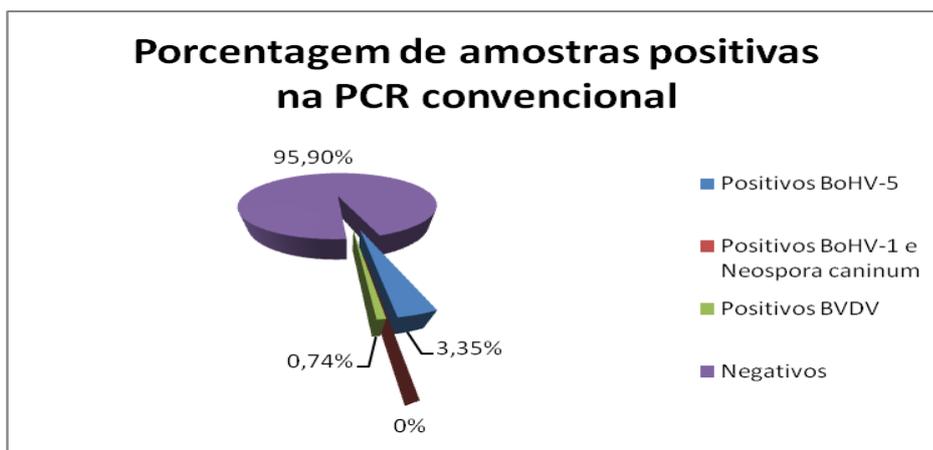
O teste demonstrou ser específico ao BoHV-1 e 5, avaliou-se a especificidade frente a agentes da família *Herpesviridae* e agentes incluídos na lista de diagnóstico diferencial das encefalites por provocarem sintomatologia semelhante. Sendo assim não observou amplificação para os herpesvírus bovino tipo 2, o herpesvírus equino, o vírus da febre catarral maligna e para o protozoário *Neospora caninum*.

Diallo, Corney e Rodwell (2011) incluíram outros agentes no teste de especificidade analítica e foi negativo para *A. pyogenes*, *H. somni*, *C. fetus venerealis*, *T. fetus*, *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, *P. multocida* e *M. haemolytica*.

## 5.5 DETECÇÃO DO BoHV-1 E 5 EM AMOSTRAS CLÍNICAS

### 5.5.1 RESULTADOS DA PCR CONVENCIONAL

Foram analisadas 268 amostras clínicas de SNC por este método e obteve-se 3,35% de amostras positivas para o BoHV-5 (9/268) e nenhuma amostra positiva para o BoHV-1, ainda que o controle positivo tenha funcionado adequadamente. Considerando que o Laboratório de Viroses de Bovídeos inclui estas amostras no processo de análise do diagnóstico diferencial das encefalites, outros agentes foram diagnosticados e encontrou-se 0,74% (2/268) amostras positivas para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pela técnica de PCR convencional, e nenhuma amostra positiva para o *Neospora caninum* utilizando-se a *nested* PCR convencional (Gráfico 1).

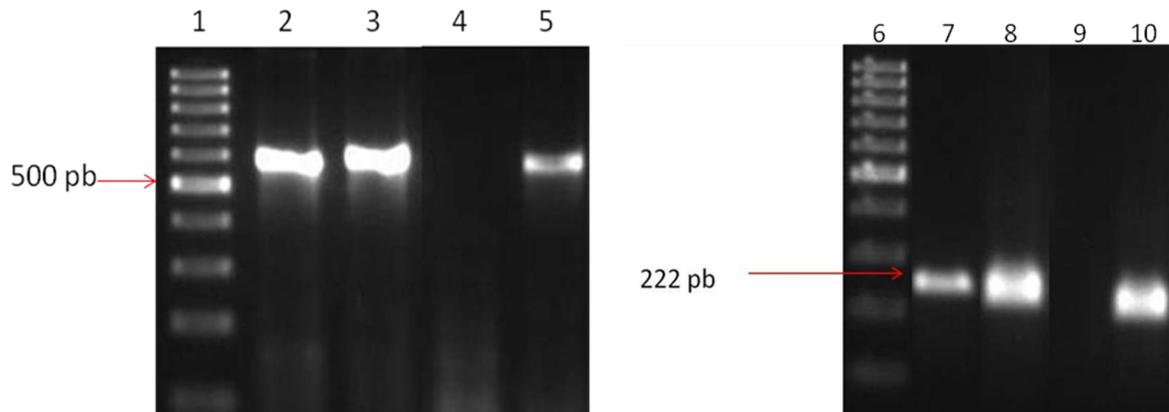


**Gráfico 1 – Porcentagem das amostras positivas na PCR convencional, para os agentes BoHV-1 e 5, *Neospora caninum* e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).**

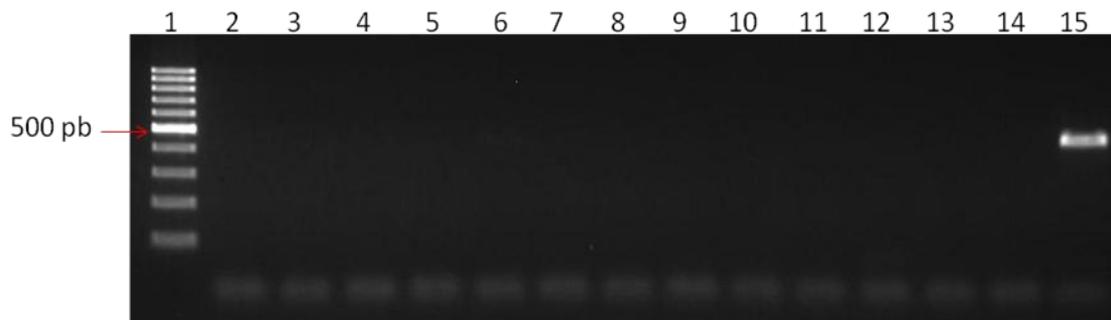
#### 5.5.1.1 Interpretação do resultado da PCR convencional

As amostras foram consideradas negativas quando não houve amplificação do gene alvo, não visualizando assim a banda na altura correspondente ao tamanho do fragmento a ser amplificado. Foram consideradas amostras positivas para o BoHV-5 na primeira amplificação, quando foi possível visualizar uma banda na altura de 593 pb e positivas na *nested* PCR quando obteve-se o produto amplificado na altura de 222 pb (Figura 10). O produto esperado para o BoHV-1 é de 344 pares de base na *nested* PCR (Figura 11). O

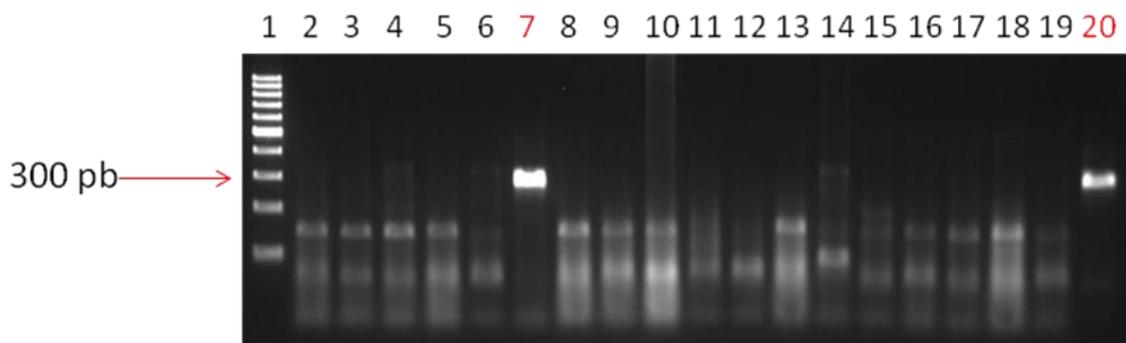
produto amplificado para o BVDV corresponde a 290 pb da região 5' não traduzida (5' UTR) (Figura 12) e para o *Neospora caninum* 250 pb do gene do DNA ribossomal da ITS1.



**Figura 10 – Gel de agarose ilustrando amostras positivas para o BoHV-5 nas canaletas 1 e 6 estão representados o marcador molecular de 100bp, canaletas 2 e 3 amostras positivas para o BoHV-5 na primeira amplificação, canaleta 4: controle negativo, canaleta 5: controle positivo (593 pb), canaletas: 7 e 8 amostras positivas para o BoHV-5 na segunda amplificação (*nested PCR*), canaleta 9: controle negativo *nested PCR*, canaleta 10: controle positivo BoHV-5 *nested PCR* (222pb).**



**Figura 11 - Gel de agarose ilustrando amostras negativas na *nested PCR* para o BoHV-1, representado pelas canaletas 2 a 13, canaleta 1: marcador molecular de 100 pb, canaleta 14: controle negativo e canaleta 15: controle positivo BoHV-1 amplificando um produto de 344 pb.**



**Figura 12 – Gel de agarose ilustrando amostra positiva para o BVDV na canaleta 7, amplificando a 290 pb, canaleta 01: marcador molecular de 100 pb, canaletas 2 a 6 e 8 a 18 amostras negativas para o BVDV, canaleta 19: controle negativo, canaleta 20: controle positivo BVDV.**

Em 2002 o LVB obteve 1,6% de amostras positivas para o BVDV e em 2003 foram 2,04%, apesar de ser associado a doenças neurológicas e ser frequentemente isolado de cérebros de fetos abortados e natimortos, o envolvimento do BVDV com doenças neurológicas de animais adultos ainda carece de confirmação, e sugere que as amostras positivas para o BVDV seja de animais persistentemente infectados que eventualmente desenvolveram enfermidade neurológica de outra etiologia (FLORES et al, 2005).

A baixa frequência de SNC positivos para *Neospora caninum* foi observada também no trabalho realizado por Malaguti et al. (2012), no qual foram analisadas 302 amostras de bovinos com síndrome neurológica no período de janeiro 2007 a abril de 2010, encontrou-se dois casos positivos para o *Neospora caninum*.

Esses relatos indicam a necessidade do diagnóstico diferencial das amostras negativas para o diagnóstico da raiva como preconiza o PNCRH (BRASIL, 2009).

### 5.5.2 RESULTADOS DA qPCR MULTIPLEX

As 268 amostras de SNC submetidas à qPCR *multiplex*, detectou-se 3,35% (9/268) positivas para o BoHV-5. Houve concordância entre as técnicas de *nested* PCR convencional e qPCR *multiplex*. Diallo, Corney e Rodwell (2011) realizaram a qPCR multiplex de 13 amostras clínicas sendo que 11 amostras eram positivas para o BoHV-1, ao submeter na *multiplex* PCR convencional e q PCR *multiplex* os resultados concordaram entre as duas técnicas, no entanto, 2 amostras eram positivas para o BoHV-1 e 5, porém realizou-se apenas a qPCR *multiplex* a qual resultou positiva para os dois agentes.

Foram consideradas amostras positivas, quando foi possível observar a curva de amplificação da amostra com valores de Cq inferiores a 40, a Figura 13 ilustra o perfil das amostras positivas, a curva padrão e o controle negativo.

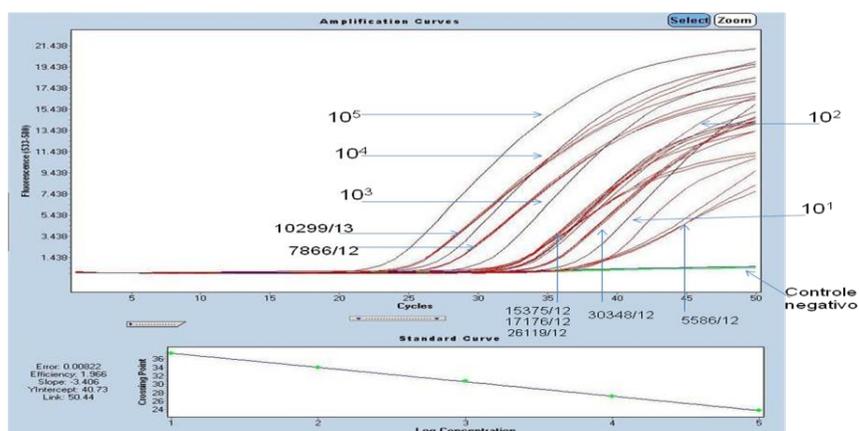


Figura 13 – Amostras positivas para o BoHV-5 na qPCR *multiplex*, curva padrão e controle negativo.

Os valores de Cq e a média de concentração das amostras positivas para o BoHV-5 na qPCR *multiplex* estão representados no Quadro 17.

**Quadro 17 – Médias Cq e Concentração das amostras positivas para o BoHV-5.**

Número de registro da amostra / ano	Média Cq <i>multiplex</i>	Média da Concentração <i>multiplex</i>
7866/12	27,73	$6,79 \times 10^3$
7866/12	27,74	$6,74 \times 10^3$
7866/12	27,78	$6,54 \times 10^3$
15375/12	32,39	$2,88 \times 10^2$
15375/12	32,25	$3,16 \times 10^2$
15375/12	32,44	$2,78 \times 10^2$
17176/12	32,67	$2,38 \times 10^2$
17176/12	32,58	$2,52 \times 10^2$
17176/12	32,74	$2,27 \times 10^2$
26119/12	32,32	$2,73 \times 10^2$
26119/12	32,55	$2,33 \times 10^2$
26119/12	31,75	$4,44 \times 10^2$
30348/12	35,05	$4,74 \times 10^1$
30348/12	34,98	$4,97 \times 10^1$
30348/12	35,02	$4,82 \times 10^1$
5586/13	39,49	$6,62 \times 10^{-2}$
5586/13	38,79	$7,23 \times 10^{-1}$
5586/13	39,67	$3,18 \times 10^{-2}$
10299/13	25,50	$3,09 \times 10^4$
10299/13	25,52	$3,03 \times 10^4$
10299/13	25,61	$2,87 \times 10^4$
160/14	33,39	$1,46 \times 10^2$
160/14	33,57	$1,29 \times 10^2$
160/14	33,84	$1,07 \times 10^2$
161/14	36,69	$1,56 \times 10^1$
161/14	35,93	$2,61 \times 10^1$
161/14	36,00	$2,48 \times 10^1$

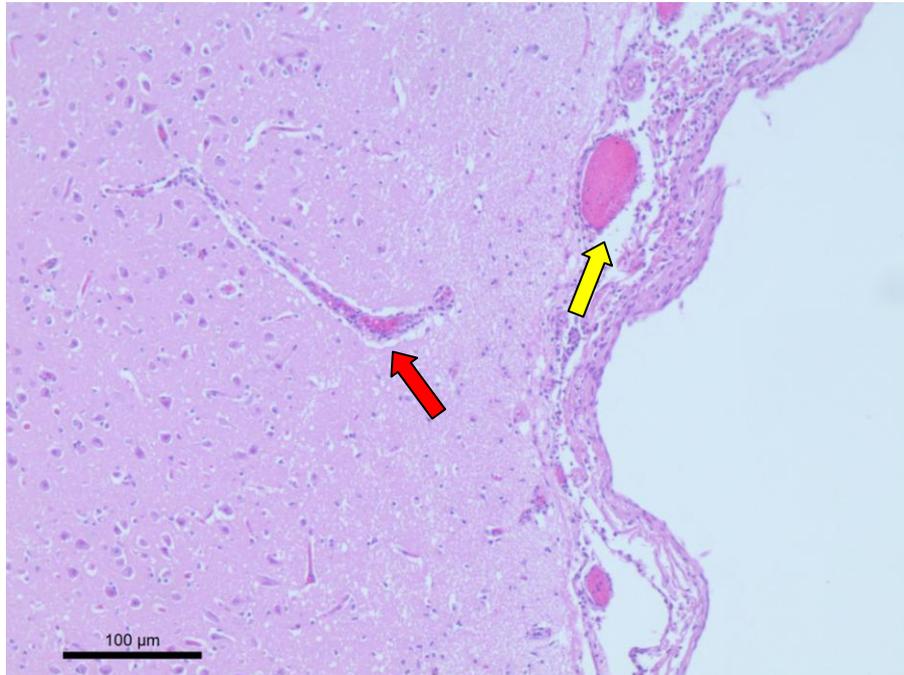
### 5.5.3 RESULTADOS DO ISOLAMENTO VIRAL E HISTOPATOLOGIA

Obteve-se 77,8% (7/9) de amostras positivas para o BoHV-5 no isolamento viral, das amostras caracterizadas positivas pela qPCR *multiplex* e *nested* PCR. O insucesso no isolamento de duas amostras acredita-se que pode ter sido devido à má qualidade da amostra (autólise do tecido) ou ainda levantou-se a hipótese das células estarem com os seus receptores alterados e impedindo assim a replicação viral, contudo para confirmar esta hipótese inoculou-se vírus padrão de BoHV-5 na mesma partida de células e o ciclo de replicação viral foi de acordo com o esperado, excluindo esta possibilidade. Outra possibilidade seria a detecção do DNA viral de infecção latente, o que não ocorreu, porque todas as amostras positivas apresentaram lesões de meningoencefalite não purulenta (MENP) características de infecção aguda por BoHV-5 (MENP) (Figura 14), exame histopatológico realizado pelo Laboratório de Anatomia Patológica. A figura 15 ilustra uma amostra sem lesões características de MENP. Estas lesões de MENP foram observadas inclusive na amostra autolisada LVB 15375/12 e contaminada LVB 26119/12, onde se obteve insucesso no isolamento viral, dados representados na Tabela 1.

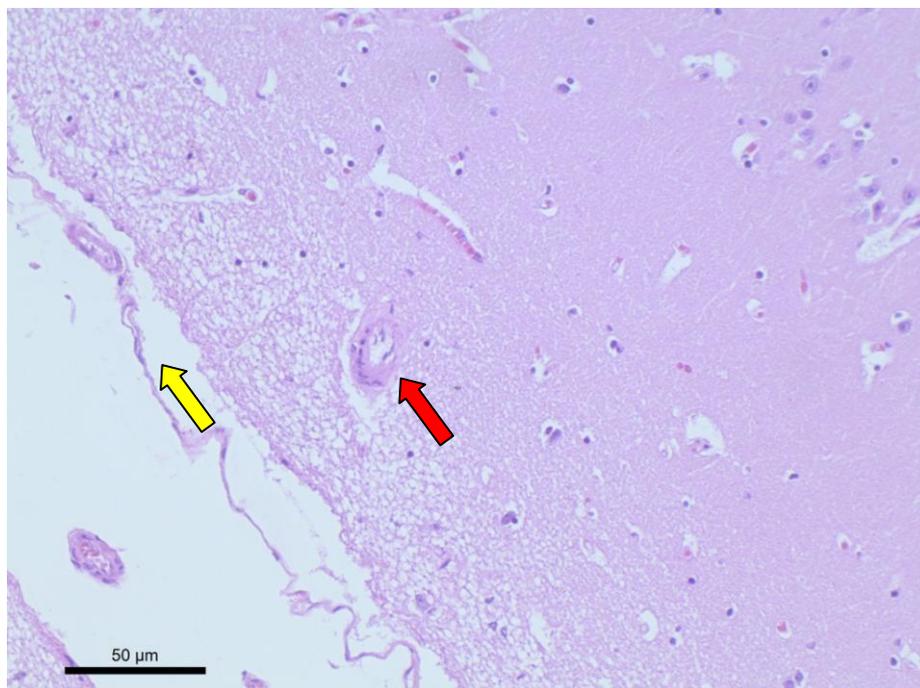
A amostra LVB 26119/12 positiva na *nested* PCR para o BoHV-5, no isolamento viral apresentou uma contaminação, necessitando assim ser filtrada. Ao realizar a quantificação do DNA extraído através do equipamento QuantiFluor™ (Promega®) foi possível notar a presença de maior quantidade de DNA extraído, não interferindo no resultado da *nested* PCR, porém demonstrou inibição na amplificação do DNA na triplicata da qPCR *multiplex*, necessitando assim que o DNA extraído fosse diluído 1:10 para obter a amplificação do material, os valores da quantificação do DNA extraído estão representados na Tabela 1.

Também não houve correlação entre carga viral na qPCR *multiplex* e o tempo de isolamento viral, mesmo quando a carga viral era baixa, foi possível o isolamento, provavelmente devido a boa sensibilidade deste método, pois se na amostra estão contidas partículas virais íntegras obtém-se sucesso no isolamento viral.

Através da técnica de isolamento viral foi possível isolar duas amostras positivas e caracterizadas pela microscopia eletrônica como herpesvírus, no entanto nenhuma das duas técnicas realizadas (*nested* PCR e qPCR *multiplex*) foram possíveis detectar como positivas para o BoHV-1 ou 5. Acredita-se na possibilidade de algum outro herpesvírus causar a encefalite no animal, resta investigar qual herpesvírus poderia ser o agente causador, uma vez que foi testado para o vírus da Febre Catarral Maligna e também resultou negativo (Figura 16).



**Figura 14 -** Córtex cerebral de bovino com MENP. Meninge com infiltrado inflamatório mononuclear e congestão vascular (seta amarela); neuropilo congestionado com manguito perivascular mononuclear (seta vermelha). (Aumento 200 x e coloração HE).

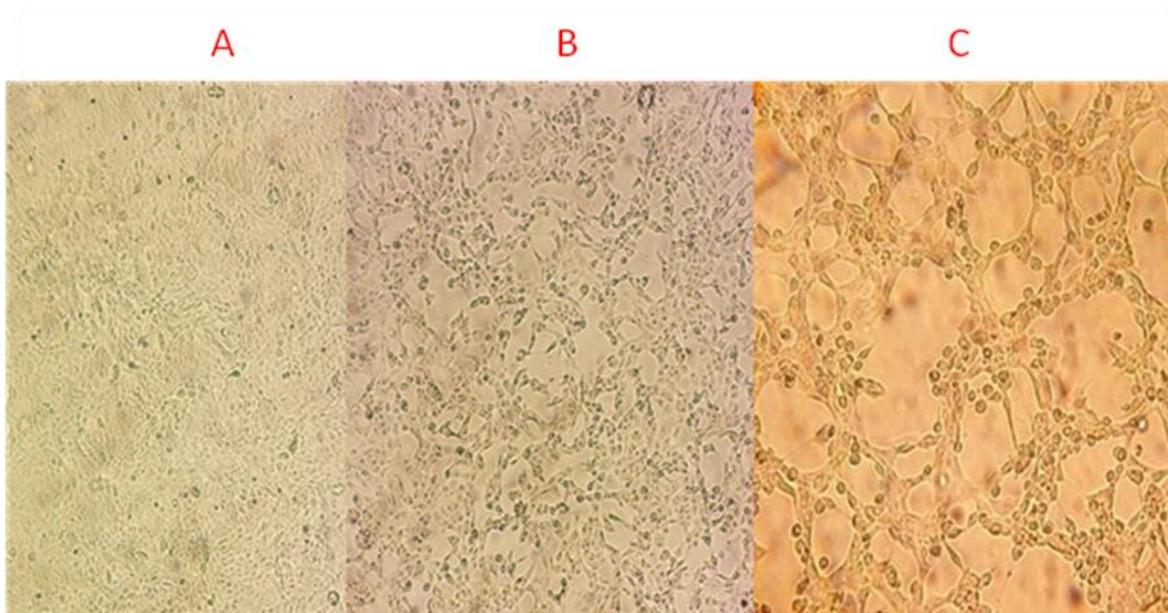


**Figura 15 -** Córtex cerebral de bovino. Meninge sem infiltrado inflamatório mononuclear e sem congestão (seta amarela); neuropilo sem manguito perivascular mononuclear e sem congestão (seta vermelha). (Aumento 200 x e coloração HE).

Tabela 1 – Resultado obtido no isolamento viral, qPCR *multiplex* e histopatológico

Número registro LVB amostra / ano	Quantificação do DNA em ng/ $\mu$ L	Resultado Isolamento viral	Média Cq <i>multiplex</i>	Média [ ] <i>multiplex</i>	Resultado histopatologia
7866/12	1,20	Positivo 3 <sup>a</sup> .passagem, 2 <sup>o</sup> . dia leitura	27,74	6,74 x 10 <sup>3</sup>	MENP*
15375/12	4,90	Negativo	32,39	2,88 x 10 <sup>2</sup>	MENP Amostra autolisada
17176/12	3,10	Positivo 2 <sup>a</sup> . passagem, 3 <sup>o</sup> . dia de leitura	32,67	2,38 x 10 <sup>2</sup>	MENP
26119/12	19,60	Contaminada Precisou ser filtrada Negativo	32,32	2,73 x 10 <sup>2</sup>	MENP
30348/12	1,40	Positivo 3 <sup>a</sup> . passagem, 5 <sup>o</sup> . dia de leitura	35,02	4,82 x 10 <sup>1</sup>	MENP
5586/13	1,70	Positivo 2 <sup>a</sup> . passagem, 1 <sup>o</sup> . dia de leitura	39,49	6,62 x 10 <sup>-2</sup>	MENP
10299/13	1,60	Positivo 3 <sup>a</sup> . passagem, 1 <sup>o</sup> . dia de leitura	25,52	3,03 x 10 <sup>4</sup>	MENP
160/14	1,50	Positivo 1 <sup>a</sup> . passagem, 2 <sup>o</sup> . dia de leitura	33,57	1,29 x 10 <sup>2</sup>	MENP
161/14	1,40	Positivo 1 <sup>a</sup> . passagem, 3 <sup>o</sup> . dia de leitura	36,00	2,48 x 10 <sup>1</sup>	MENP
21713/13	2,00	Positivo 2 <sup>a</sup> passagem, 5 <sup>o</sup> . dia de leitura	Negativo	Negativo	MENP
29903/13	1,90	Positivo na 3 <sup>a</sup> . passagem, 2 <sup>o</sup> . dia de leitura	Negativo	Negativo	MENP

\*MENP = Meningoencefalite não purulenta.



**Figura 16 – Foto A representa o cultivo celular sem a inoculação da amostra clínica (controle negativo), linhagem MDBK; a foto B representa o efeito citopático de material isolado de SNC, identificação da amostra: LVB 21713/13 caracterizado pela microscopia eletrônica como herpesvírus bovino, no entanto, não identificado pelas técnicas moleculares do presente estudo; a foto C refere-se ao efeito citopático de um herpesvírus bovino isolado de SNC, caracterizado como BoHV-5, identificação da amostra LVB 160/14.**

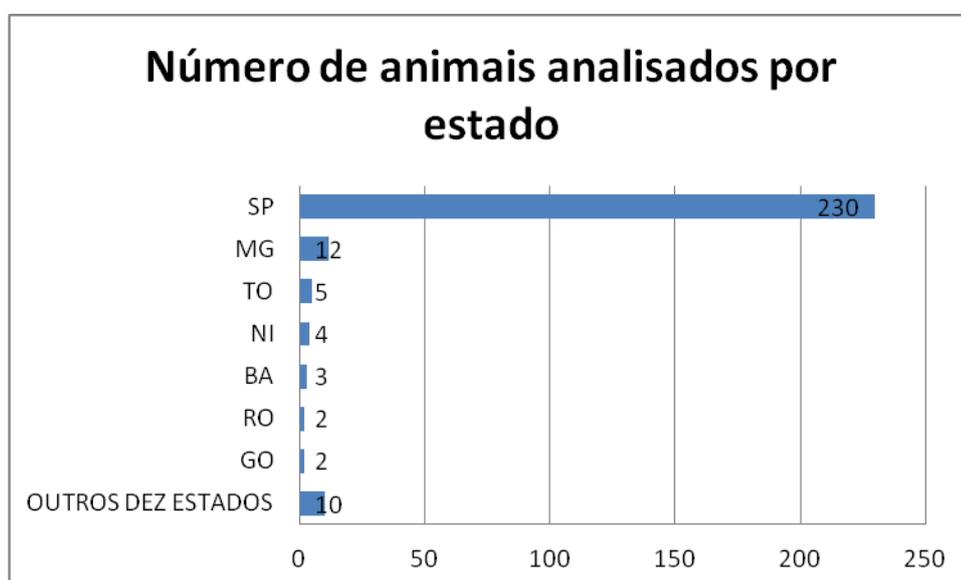
A fim de diferenciar infecção herpética latente de ativa é importante observar os resultados apresentados na Tabela 1, que resumem as informações clínico-epidemiológicas, achados histopatológicos e métodos de diagnóstico virológico, pois a presença de vírus infeccioso causa sinais clínicos e lesões teciduais, com conseqüente possibilidade de isolamento viral se o vírus estiver íntegro na amostra.

#### **5.5.4 RESULTADOS DO LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO**

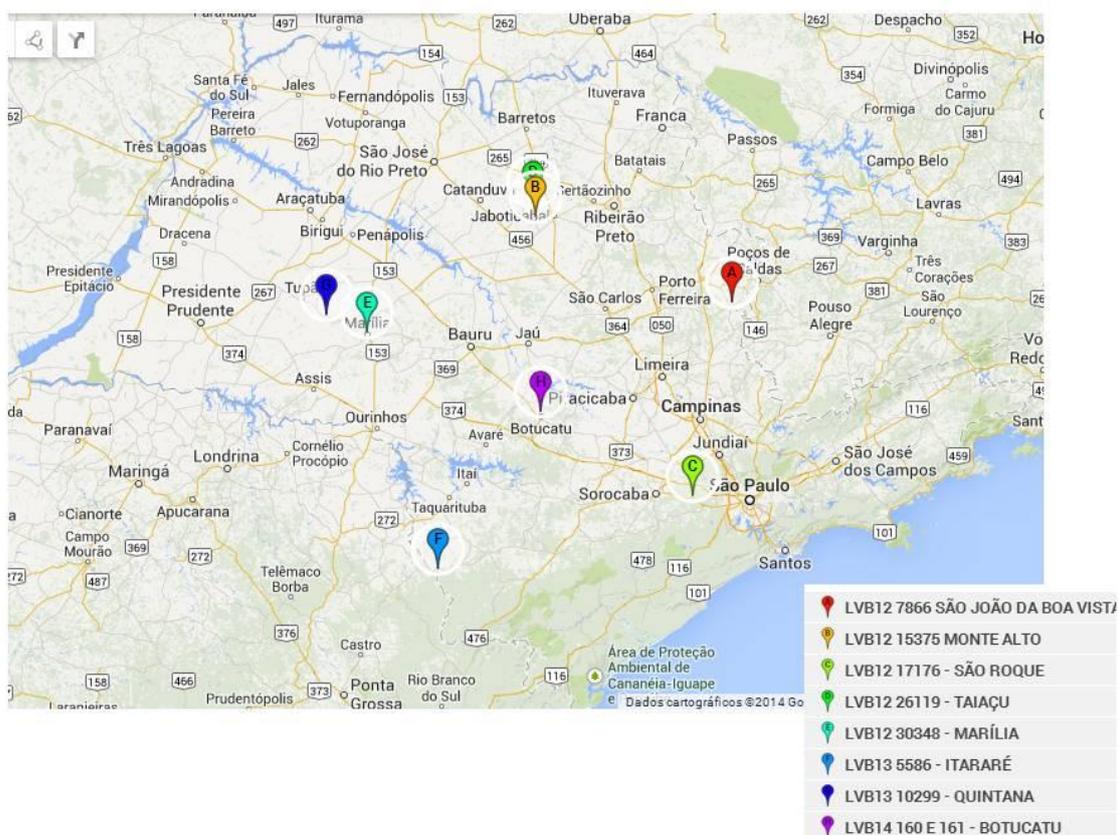
Os dados epidemiológicos extraídos das requisições nem sempre são completos dificultando assim a análise de algumas variáveis.

Na ocorrência dos casos positivos em duas ocasiões foi relatado surto, um com óbito de quatro bovinos em propriedade localizada em São Roque e outro em Botucatu, levando a óbito 13 animais; nos demais casos não foram relatados índice de mortalidade. Há carência de informação relativa à vacinação, apenas duas propriedades informaram que não praticavam vacinação contra o BoHV-1, o que possivelmente pode ter favorecido a ocorrência da meningoencefalite herpética.

Foram analisadas 268 amostras de SNC oriundas de diversos estados do Brasil, no entanto, o maior número de amostras foi do estado de São Paulo (230 amostras), isto se deve ao fato do Instituto Biológico possuir credenciamento junto ao MAPA para atendimento a demanda de exames para vigilância epidemiológica de doenças do sistema nervoso central deste estado. A distribuição das demais amostras foi Minas Gerais (12), Tocantins (05), Bahia (03), Rondônia (02), Goiás (02), e recebemos uma amostra de cada estado a seguir: Alagoas, Amapá, Ceará, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná e Rio de Janeiro, sendo que 04 amostras não foram informadas o estado de procedência (Gráfico 02). Todas as amostras positivas para o BoHV-5, são provenientes do estado de São Paulo e de diversos municípios, como representado pela Figura 17.



**Gráfico 2 – Número de animais analisados por estado, NI: não informado, outros dez estados correspondem a: Alagoas, Amapá, Ceará, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná e Rio de Janeiro.**



**Figura 17 – Mapa do estado de São Paulo ilustrando os municípios com bovinos positivos para o BoHV-5.**

Encontrou-se 3,35% de amostras positivas ao BoHV-5, sendo que no estado de São Paulo a ocorrência foi de 3,91% (9/230) essa ocorrência está de acordo com trabalhos realizados por outros autores como Galiza et al. (2010) que encontraram 2,7% de casos positivos para o BoHV-5 na região do semiárido nordestino. Sanches et al. (2000) também obteve resultados semelhantes com 4,59% na região Sul do Brasil, no entanto Fonseca et al. (2011) obteve cerca de 15% de amostras positivas para o estado de Minas Gerais, o qual não realizou o isolamento viral destas amostras, portanto, comprovou-se apenas a presença do DNA viral. Estes dados indicam que a incidência do BoHV-5 pode ser bastante variável conforme a região estudada.

Encontrou-se positividade em três animais da raça nelore e um mestiço de tabapuã, dois animais foram descritos sem raça definida, um mestiço e dois não foram informados a raça, confirmando a ocorrência do BoHV-5 em raças zebuínas como Colodel et al. (2002) e outros autores vêm demonstrando, contradizendo o fato de que o BoHV-5 estaria mais adaptado a raças zebuínas como mencionado por Studdert (1989).

Segundo considerações de Thiry et al. (2006) os países europeus e norte americanos possuem baixa incidência do BoHV-5 devido a imunidade contra o BoHV-1 seja

por infecção natural ou por vacinação, que confere proteção aos animais, no entanto, a prevalência obtida no trabalho de Silva (2011) indica que no estado de São Paulo, em bovinos (fêmeas) com idade superior a 24 meses a prevalência para o BoHV-1 encontra-se em torno de 58% a 80% e para o BoHV-5 de 57% a 73%, o que deveria então conferir imunidade ao animais, no entanto é possível notar a ocorrência do BoHV-5 no rebanho do estado de São Paulo como demonstrou o presente trabalho e também em outros estados brasileiros.

Diversos autores como Colodel et al. (2002), Riet-Correa et al. (2006), Rissi et al. (2007), Zajac et al. (2010), tem relatado a ocorrência da meningoencefalite herpética principalmente em animais jovens, ocorrendo ocasionalmente em animais adultos, no presente estudo os animais foram divididos em grupos com um intervalo de idade em meses (Tabela 2) e observou-se 3,45% (1/29) de animais positivos com idade entre 0 e 6 meses, 5,9% (1/17) em animais entre 6 e 12 meses, 7,15% (4/56) em animais com idade de 12 a 24 meses e 0,96% (1/104) em animais com idade superior a 36 meses, ou seja, observou-se a elevada porcentagem de animais positivos para o BoHV-5 em animais com idade até 24 meses e também a rara ocorrência em animais adultos como descreve a literatura, dados representado através do Gráfico 3. Informações detalhadas dos animais positivos podem ser obtidas no Apêndice E.

**Tabela 2 – Tabela representando a idade dos animais analisados e a porcentagem de animais positivos.**

<b>IDADE</b>	<b>PORCENTAGEM DE POSITIVOS</b>
<b>00  — 06 meses</b>	3,45 (1/29)
<b>06  — 12 meses</b>	5,90 (1/17)
<b>12  — 24 meses</b>	7,15 (4/56)
<b>24  — 36 meses</b>	0 (0/29)
<b>&gt; 36 meses</b>	0,96 (1/104)
<b>Não informado</b>	6,06 (2/33)
<b>TOTAL</b>	3,35 (09/268)



**Gráfico 3 – Número de amostras positivas para o BoHV-5 de acordo com a idade do animal**

A ocorrência do BoHV-5 possui fatores de risco importantes associados com o desenvolvimento da doença, como o desmame (6 a 8 meses) do animal e submeter o animal a situações de estresse, como obtivemos animais jovens positivos, possivelmente podem ter passado por um processo estressante durante o desmame desenvolvendo assim a enfermidade uma vez que Rissi et al. (2006) constataram que em 6 das 8 propriedades estudadas os bovinos haviam sido desmamados em um período de 20 a 120 dias antes do início da doença.

Constatou-se maior número de machos positivos 6,67% (5/75), apesar de menor número de animais examinados em relação às fêmeas (Tabela 3). Este fato também foi relatado por Lunardi et al. (2009) o qual avaliou animais em um surto ocorrido em Apucarana no estado do Paraná (Brasil), confirmando o BoHV-5 em nove animais, dentre eles oito machos e uma fêmea.

**Tabela 3 - Representação dos animais positivos com relação ao sexo dos animais.**

SEXO	BoHV-5 POSITIVOS	PORCENTAGEM POSITIVOS	
Fêmeas	1	0,63	(1/160)
Machos	5	6,67	(5/75)
Não informado	4	12,12	(4/33)

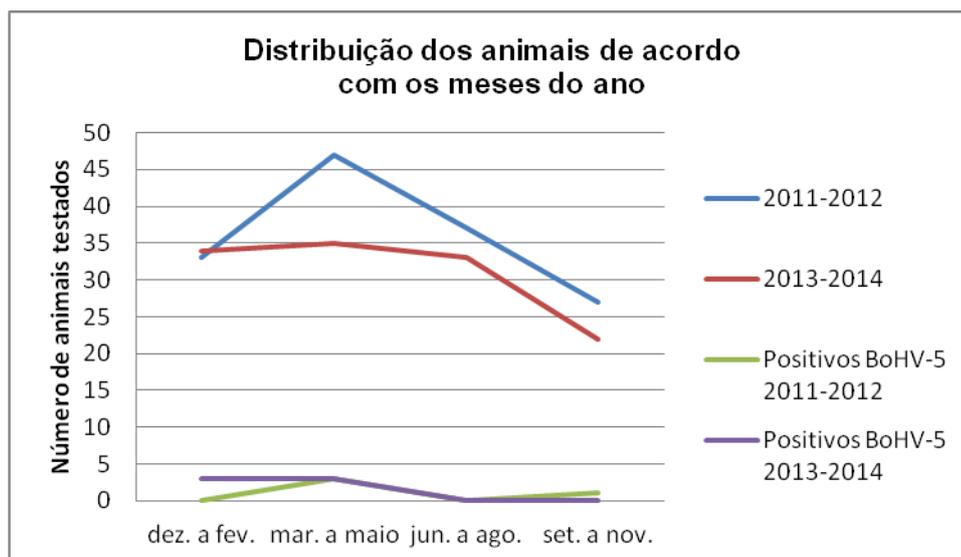
Em estudos anteriores no Laboratório de Virose de Bovídeos com amostras de SNC de bovinos do período de 2005 a 2006, detectou-se 13 amostras positivas para o BoHV-5, sendo 09 machos e 03 fêmeas e um animal não foi informado o sexo. Mais uma vez evidenciando a maior frequência de BoHV-5 positivos em machos, isto alerta para necessidade de mais estudos para verificar se este fato trata-se de apenas uma coincidência ou se há de fato diferença de resposta imunológica entre os gêneros.

Estudos realizados em humanos e roedores mostraram que fêmeas tem característica de montar uma resposta imune mais alta do que os machos (KLEIN; JEDLICKA; PEKOSZ, 2010). Marques (2013) também observou que fêmeas tem maior capacidade de resposta aos anticorpos contra proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa, ao realizar levantamento em bovinos comparando porcentagem de reagentes e não reagentes por gênero, constatou diferença de resposta entre machos e fêmeas, sendo a porcentagem de fêmeas reagentes as proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa maior do que nos machos. Investigações sob condições controladas são necessárias estudar os fatores envolvidos, sendo uma das hipóteses ciclo hormonal das fêmeas.

Apesar de não ter nenhum relato com relação à época do ano que a encefalite herpética se manifesta, os dados das amostras positivas para estes dois anos demonstram que a maior ocorrência se deu nos meses de dezembro a maio, como representado no Gráfico 4 e Tabela 4. No entanto, ao analisarmos com os demais isolados do LVB de anos anteriores não foi possível observar uma maior prevalência nestes meses, e sim nos meses de junho a novembro, estudos mais aprofundados devem ser realizados para verificar se existe uma determinada sazonalidade para este agente.

**Tabela 4 – Número de amostras analisadas e amostras positivas para o BoHV-5 de acordo com os meses do ano.**

	dez. a fev.	mar. a maio	jun. a ago.	set. a nov.
2011 a 2012	33	47	37	27
2013 a 2014	34	35	33	22
Positivos BoHV-5 2011 a 2012	0	3	0	1
Positivos BoHV-5 2013 a 2014	3	3	0	0



**Gráfico 4 – Gráfico da distribuição dos animais testados de acordo com os meses do ano e a maior ocorrência do BoHV-5 nos meses de dezembro a maio**

Os sinais clínicos relatados nas fichas de requisição são semelhantes aos da raiva e por isso a importância de se realizar o diagnóstico diferencial, a gravidade dos sintomas e a rapidez com que a doença se manifesta desde o início do quadro clínico até o óbito do animal, reforça a necessidade do programa de vigilância epidemiológica, ressaltando também que a enfermidade ocasiona surtos de mortalidade nas propriedades, promovendo assim um grande prejuízo à cadeia produtiva.

Os sinais clínicos relatados foram: anorexia, incoordenação motora, sialorreia, decúbito, bruxismo (ranger dos dentes), movimentos de pedalagem, paralisia flácida dos membros, depressão, tremores, opistótono, cegueira. Todos estes sinais têm sido relatados por Barros et al. (2006), Halfen; Riet-Correa (2007), Del Médico Zajac et al. (2010), entre outros autores.

A média de duração do sinal clínico observada neste estudo foi de dois a seis dias, coincidindo assim com a literatura que informa um quadro clínico de três a quinze dias, com maioria das mortes ocorrendo entre um a seis dias (ELIAS; SCHILD; RIET-CORREA, 2004; BARROS et al., 2006). No surto estudado por Lunardi et al. (2009) observou-se uma variação de 18 horas a 21 dias, sendo assim dividida em formas da doença pré aguda, aguda e subaguda ou crônica; na qual as formas pré aguda e aguda são caracterizadas por disfunções neurológicas progressivas e a forma crônica a qual não se observa disfunção progressiva. Infelizmente devido à falta de informação enviada na requisição de exame, em boa parte dos animais positivos não foram informados o período de início dos sinais clínicos

até o óbito do animal, impossibilitando assim maiores estudos epidemiológicos do quadro clínico da enfermidade.

As técnicas frequentemente empregadas para o diagnóstico do BoHV-1 e 5 são isolamento viral em cultivo celular e PCR convencional. A padronização da qPCR *multiplex* nos demonstrou ser uma ótima ferramenta para a detecção destes agentes, devido a rapidez no diagnóstico auxiliando assim a tomada de decisões e diminuindo o prejuízo da cadeia produtiva, uma vez que demonstrou sensibilidade diagnóstica semelhante à *nested* PCR.

A qPCR *multiplex* demonstrou ser mais vantajosa que a *nested* PCR, pois forneceu uma sensibilidade diagnóstica semelhante a *nested* PCR, apresentou um menor risco de contaminações e tornou um método de diagnóstico para o BoHV-1 e 5 mais rápido, possibilitando assim um aumento no número de amostras testadas em menor número de tempo que a *nested* PCR e além da prova ser mais específica devido à utilização de sondas marcadas com fluoróforos para o fragmento alvo (OIE, 2012; BUSTIN et al., 2009; ABRIL et al., 2004).

Além disso demonstrou especificidade e um excelente método de diagnóstico laboratorial, contribuindo assim para a vigilância epidemiológica da enfermidade uma vez a enfermidade encontra-se com elevada frequência principalmente no Brasil, possibilitando assim a agilidade no diagnóstico.

## 6. CONCLUSÃO

- 1) Obteve-se sucesso na padronização da qPCR *multiplex*, detectou-se sensibilidade analítica de  $10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ L, para o BoHV-1 e 5.
- 2) A qPCR *multiplex* demonstrou ser tão sensível quanto a *nested* PCR, e possui a vantagem sobre a *nested* PCR por ser uma técnica de rápida execução e com menor risco de contaminação.
- 3) A ocorrência do BoHV-5 3,35% (9/269), foi detectada principalmente nos animais com idade de 12 a 24 meses, evidenciando esta faixa etária ser importante fator de risco a ser considerado em estudos epidemiológicos e nas medidas profiláticas a serem implementadas.
- 4) A rapidez da qPCR *multiplex* no diagnóstico do BoHV-1 e 5, permite a confirmação destes agentes em tempo oportuno contribuindo com o sistema de vigilância epidemiológica do PNCRH e da EEB.

- 5) A fim de diferenciar infecção latente de ativa, o diagnóstico da encefalite herpética deve ser associado com informações clínico-epidemiológicas, achados histopatológicos e isolamento viral.
- 6) Investigações sob condições controladas devem ser realizadas para esclarecer se há diferença na capacidade de resposta entre machos e fêmeas para o BoHV-5.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, C.; ENGELS, M.; LIMAN, A.; HILBE, M.; ALBINI, S.; FRANCHINI, M.; SUTER M.; ACKERMANN, M. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3644-3653, 2004.

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3-4, p. 293-302, 2006.

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a *multiplex* polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. **Journal of Veterinary Medicine - Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 8, p. 613-621, 2001.

ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.

ASHLEY, R. L.; COREY, L.; DALESSIO, J.; WILSON, P.; REMINGTON, M.; BARNUM, G.; TRETHERWEY, P. Protein-specific cervical antibody responses to primary genital herpes simplex virus type 2 infections. **The Journal of infectious disease**, v.170, n. 1, p. 20-26, 1994.

BARENFUS, M.; DELLIQUADRI, C. A.; MCINTYRE, R. W.; SCHROEDER, R. J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 1, n. 143, p. 725-728, 1963.

BARROS, C. S. L.; MARQUES, G. H. F. **Procedimentos para o diagnóstico de doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50 p.

BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS, R. A. A. Doenças causadas por vírus e príon. In: *Ibid* (Eds). **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**. São Paulo: Coleção Valee, 2006. p. 21-47.

BARTHA, A.; HAJDU, G.; ALDÁSY, P.; PACZOLAY, G. Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis in calves in Hungary. **Acta Veterinariae Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, n. 2, p. 145-151, 1969.

BATISTA, H. B. C. R.; SCHMIDT, E.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1023-1028, 2010.

BECK, B. E. Infectious bovine rhinotracheitis encephalomyelitis in cattle and its differential diagnosis. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 16, n. 9, p. 269-271, 1975.

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**, v. 20, n. 4, p. 144-150, 2000.

BILGE DAGALP, S.; ALKAN, F.; ÇALISKAN, E.; YILDIRIM, Y.; OGUZOGLU, T. Ç.; CAN SAHNA, K.; BURGU, I. The investigation of the herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) on the occurrence of the reproductive disorders in dairy cattle herds, Turkey. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 163, n. 4, p. 206-211, 2012.

BOEHMER, P. E.; LEHMAN, I. R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 347-384, 1997.

BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS-ANJOS, G.; BUENO, C. R.; SALVATIERA-OPORTO, J.; D'AVILA, A. M. R.; GRISARD, E. C.; ZANETTI, C. R. Detection and characterization of rabie vírus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 695-708, 2005.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras Encefalopatias – PNCRH**. Cartilha técnica da Encefalopatia Espongiforme Bovina, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 23 set. 2013.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras Encefalopatias – PNCRH**. Manual Técnico para o Controle da Raiva dos Herbívoros, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 23 set. 2013.

CARDOSO, T. C.; FRADE, C. S.; TÁPARO, C. V.; OKAMURA, L. H.; FLORES, E. F. Validation of a reference control for an SYBR-Green fluorescence assay-based real-time PCR for detection of bovine herpesvirus 5 in experimentally exposed bovine embryos. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, n. 5-6, p. 237-242.

CAWTHRAW, S.; SAUNDERS, G. C.; MARTIN, T. C.; SAWYER, J.; WINDL, O.; REANEY, S. D. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1055-1062, 2009.

CHOWDHURY, S.; SHARMA, B. Transcription gD and gI genes in BHV-1-infected cells. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 1 Supplement, p. 971-976, 2012.

CHOWDHURY, S. I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. **Virology**, v. 10, n. 213, p. 558-568, 1995.

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

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

D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; SPILKI, F.; ROEHE, P. M.; ARNS, C. W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315-324, 2002.

DEL FAVA, C. **Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte, infectados e não infectados pelo herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1)**. 2001. 127p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 5, n. 3, p. 300-312, 2002.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; OLIVEIRA, J. V.; REICHERT, R. H.; D'ANGELINO, J. L. D. Reproductive rates and performance traits in beef cattle infected by Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 739-746, 2006.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.; SADIR, A. M.; ROMERA, S. A.; BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 327-334, 2006.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 138-145, 2010.

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, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DELHON, G. Replicação dos vírus DNA. In: FLORES, E. F., **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 06, p. 156-160.

DIALLO, I. S.; HEWITSON, G. R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B. G.; RODWELL, B. J. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 3, p. 93-95, 2010.

DIALLO, I. S.; CORNEY, B. G.; RODWELL, B. J. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a *multiplex* real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 175, n. 1, p. 46-52, 2011.

DIEL, D. G.; FONSECA, E. T.; SOUZA, S. F.; MAZZANTI, A.; BAUERMANN, F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 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.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. The Eighth Report. San Diego: Academic Press, 2004. p. 1162.

FAVIER, P. A.; MARIN, M. S.; PÉREZ, S. E. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. **Open Veterinary Journal**, v. 2, n. 1, p. 46-53.

FEHLER, F.; HERRMANN, J. M.; SAALMÜLLER, A.; METTENLEITER, T. C.; KEIL, G. M. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1 expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. **Journal of Virology**, v. 66, n. 2, p. 831-839, 1992.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary Virology**. Zaragoza: Acribia, 1992. 691 p.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary Virology**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1993. 666 p.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FLORES, E. F. Estrutura e composição dos vírus. In: FLORES, E. F., **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 01, p. 21-35.

FLORES, E. F.; KREUTZ, L. C. Replicação viral. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 05, p. 109-134.

FLORES, E. F.; CARGNELUTTI, J. F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: FLORES, E. F., **Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas**, 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 326-365.

FONSECA JÚNIOR, A. A.; COSTA, E. A.; OLIVEIRA, T. S.; SALES, E. B.; SALES, M. L.; LEITE, R. C.; HEINEMANN, M. B.; REIS, J. K. P. PCR *multiplex* para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1405-1413, 2011.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F., **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 17, p. 433-488.

GALIZA, G. J. N.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 267-276, 2010.

GALVÃO, V. A. G. Vírus e Príons. In: SAMARANAYAKE, L. P. **Fundamentos de microbiologia e imunologia na odontologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012. cap. 4. p. 26-35.

GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D., ALICE, F. J. Anticorpos neutralizantes para o vírus rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, v. 6, n. 1, p. 15-25, 1962/1963.

GIBBS, E. P.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part 1. Bovine herpesvirus I. **Veterinary Bulletin**, v. 47, p. 317-343, 1977.

GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; COSTA, E. A.; LOBATO, Z. I. P.; MENDES, L. C. N.; BORGES, A. S.; LEITE, R. C.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 1-5, 2002.

GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; SOUZA, J. G.; COSTA, E. A.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 6, p. 495–504, 2003.

GUSTAFSON, D. P. *Herpesvirus disease of mammals and birds: comparative aspects and diagnosis*, in: Kurstak, E.; Kurstak, C. **Comparative diagnosis of viral diseases**. New York: Academic Press, 1981. cap. 05, p. 205-263.

HALFEN, D. C.; VIDOR, T. Infecções por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A., **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Editora Varela, 2001. cap. 02, p. 45-162.

HALFEN, D. C.; RIET-CORREA, F. Infecção por Herpesvírus Bovino-1 e Herpesvírus Bovino-5. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.126-137.

HAY, J.; RUYECHAN, W. T. Alphaherpesvirus DNA replication. In: ARVINN, A.; CAMPADELLI-FIUME, G.; MOCARSKI, E.; MOORE, P. S.; ROIZMAN, B.; WHITLEY, R.; YAMANISHI, K. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**, Cambridge: Cambridge University Press, 2007. cap. 10, p. 138-143.

HENZEL, A.; DIEL, D. G.; ARENHART, S.; VOGEL, F. S. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras infectadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p.140-148, 2008.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, B. C. R.; CAMPOS, F. S.; SILVA, J. R.; VARELA, A. P. M.; CENCI, A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e / ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

ICTV. International Committee on taxonomy on viruses. 2013. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em 15 de abril de 2014.

ISERNHAGEN, A. J.; COSENZA, M.; COSTA, M. C. ; MÉDICI, K. C.; BALARIN, M. R. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ALFIERI, A. A.; LISBÔA, J. A. N. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 12, p. 1312-1318, 2011.

JOHNSTON, L. A. Y.; SIMMONS, G. C.; MCGAVIN, M. D. A viral meningo-encephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, n. 4, p. 207-215, 1962.

KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: IBID (Ed.). **Viral diseases of cattle**. 2<sup>nd</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p.159-170.

KLEIN, S. L.; JEDLICKA, A.; PEKOSZ, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 5, p. 338-349, 2010.

KNIPE, D. M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 211-221, 2008.

LADELFA, M. F.; ZAJAC, M. P. D. M.; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 37, 2011.

LOVATO, L. T. Classificação e nomenclatura dos vírus. In: FLORES, E. F., **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 02, p. 44.

LUNARDI, M.; CLAUS, M. P.; LISBÔA, J. A. N.; AMUDE, A. M.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Neurological and epidemiological aspects of a BoHV-5 meningoencephalitis outbreak. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. special, p. 77-85, 2009.

MAIDANA, S. S.; LADELFA, M. F.; PÉREZ, S. E.; LOMÓNACO, P. M.; ZAJAC, M. P. D. M.; ODEÓN, A.; VIERA, J. B.; COMBESSIES, G.; FONDEVILA, N.; PALACIOS, M.; THIRY, J.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 8, 2011.

MAIDANA, S. S.; MORANO, C. D.; CIANFRINI, D.; CAMPOS, F. S.; ROEHE, P. M.; SIEDLER, B.; STEFANO, G.; MAUROY, A.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. *Multiplex* PCR followed by restriction length polymorphism analysis for the subtyping of bovine herpesvirus 5 isolates. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 111, 2013.

MALAGUTI, J. M. A.; CABRAL, A. D.; ABDALLA, R. P.; SALGUEIRO, Y. O.; GALLETI, N. T. C.; OKUDA, L. H.; CUNHA, E. M. S.; FAVA, C. D. *Neospora caninum* as causative agent of bovine encephalities in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Jaboticabal**, v. 21, n. 1, p. 48-54, 2012.

MARQUES, G. H. F. A experiência brasileira na erradicação da febre aftosa e o emprego do sistema I-ELISA 3ABC/EITB para certificação sanitária de bovinos e bubalinos. 67p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

MARS, M. H.; JONG, M. C. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. **Vaccine**, v. 18, n. 19, p. 1975-1981, 2000.

MELO, C. B. **Distribuição de anticorpos neutralizantes contra o Herpesvírus Bovino 1 (HVB-1) em rebanhos bovinos de aptidão leiteira e de corte do Estado de Minas Gerais.** 1998. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.

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 type 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 633-652, 2001.

MILLER, J. M. The effects of IBR infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 95-98, 1991.

MORÁN, P. E.; FAVIER, P. A.; LOMÓNACO, M.; CATENA, M. C.; CHIAPPARRONE, M. L.; ODEÓN, A. C.; VERNA, A. E.; PÉREZ, S. E. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. **Open Veterinary Journal**, v. 3, n. 2, p. 126-130, 2013.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007.

NAKAMICHI, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 22-30, 2002.

NUGENT, J.; BIRCH-MACHIN, I.; SMITH, K. C. MIMFORD, J. A.; SWANN, Z.; NEWTON, J. R.; BOWDEN, R. J.; ALLEN, G. P.; DAVIS-POYNTER, N. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreak. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 4047-4060, 2006.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Chapter 2.4.13 – Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: OIE, 2012. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: set. 2013.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2014. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom/>>. Acesso em: maio 2014.

OKAZAKI, K.; HONDA, E.; MINETOMA, T.; KUMAGAI, T. Bovine herpesvirus 1 gp 87 mediates both attachment of virions to susceptible cells and haemagglutination. **Archives of Virology**, v. 97, n. 3-4, p. 297-307, 1987.

OLIVEIRA, G. D. R. **Caracterização molecular de herpesvírus bovinos por análise da região codificadora da glicoproteína G**. 2006. 55p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

OLIVEIRA, M. T.; CAMPOS, F. S.; DIAS, M. M.; VELHO, F. A.; FRENEAU, G. E.; BRITO, W. M. E. D.; RIJSEWIJK, F. A. M.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139-1145, 2011.

PASTORET, P. P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 13, n. 3, p. 221-235, 1982.

PAULA, R. R.; SOUZA, M. A.; COLODEL, E. M.; HÜBNER, S. O.; BRUM, K. B.; JORGE, P. H. C.; DAMASCENO, A. D. Meningomieloencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 2, 2005.

PEDRAZA-ORDOÑEZ, F.; YAMATOGI, R.S.; ARAUJO JR, J.P.; ROCHA, N.S.; ALESSI, A.C. The use of real time PCR (qPCR) for the diagnosis of bovine herpesvirus 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain samples identified as bovine unspecific encephalitis. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 4, n. 5, 2013.

PEREZ, S. E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M. R.; OSORIO, F. A.; FLORES, E. F.; ODEÓN, A. C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 437-444, 2002.

PEREZ, S. E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J. H.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 35, n. 2, p. 69-73, 2003.

PIDONE, C. L.; GALOSI, C. M.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. Herpesvirus bovinos 1 y 5. **Analecta Veterinaria**, v. 19, n. 1-2, p. 40-50, 1999.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. (Orgs.) **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América y Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, 1992. 280p.

PUENTE, E. Impacto da IBR e da BVD na reprodução bovina. In: SIMPÓSIO PFIZER, 4., 2003, Goiânia. p. 7-14.

QUINCOZES, C. G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV)**

**nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.** 2005. 117p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.** 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007. p. 2156.

RAVISHANKAR, C.; NANDI, S.; CHANDER, V.; MOHAPATRA, T. K. Concurrent testing of breeding bulls for bovine herpesvirus 1 infection (BHV-1) in India. **Veterinaria Italiana**, v. 49, n. 2, p. 145-150, 2013.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

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.

RISSI, D. R.; OLIVEIRA, F. N.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R. A. A.; BARROS, C. S. L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 123-132, 2006.

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; FLORES, E. F.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

ROCHA, M. A.; BARBOSA, E. F.; GUEDES, R. M. C.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C.; GOUVEIA, A. M. G. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a *nested* PCR assay. **Veterinary Research Communications**, v. 23, n. 2, p. 133-141, 1998.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Bovine herpesvírus-1 in semen. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 373-380. 1999.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 645-647, 2001.

ROEHE, P. M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-

5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, 1992.

ROIZMAN, B.; PELLET, P. E. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MONATH, T. P.; MELNICK, J. L.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**, 5<sup>th</sup> ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 2479-2499.

ROLLOF, B. C. **Clonagem e expressão da glicoproteína E de herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em *Pichia pastoris***. 2014. 47p. Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul.

ROS, C.; RIQUELME, M. E.; FORSLUND, K. O.; BELÁK, S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 83, n. 1-2, p. 55-65, 1999a.

ROS, C.; BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1247-1253, 1999b.

SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROHE, P. M.; OSÓRIO, 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. 75-82, 1998.

SANCHES, A. W. D.; LANGOHR, 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.

SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F.; PEREIRA, D. B.; LADEIRA, S.; RAFFI, M. B.; ANDRADE, G. B.; SCHUCH, L. F. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1993 e comentários sobre algumas doenças. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, n. 14, p. 20-22, 1994.

SCHUDEL, A. A.; CARRILLO, B. J.; WYLER, R.; METZLER, A. E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological diseases. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 33, n. 4, p. 303-310, 1986.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular Virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, 1996.

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

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 herpesvírus bovino 5 (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 3-4, p. 99-106, 1998.

SILVA, M. C. O. P. **Soroprevalência do herpesvírus bovino tipo 1 e 5 no Estado de São Paulo, Brasil**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

SILVA, A. M. **Deteção, isolamento e caracterização molecular de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 de bovinos do estado de Goiás, Brasil**. 2013. 103 p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiás.

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

SPILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; LIMA, M.; FRANCO, A. C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P. M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 43-49, 2004.

STRAUB, O. C. Infectious bovine rhinotracheitis vírus. In: DINTER, Z.; MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 71-108.

STRAUB, O. C. BHV-1 infectious: relevance and spread in Europe. **Comparative immunology, microbiology, and infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

STRAUB, O. C. Advances in BHV-1 (IBR) research. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 108, n. 10, p. 419-422, 2001.

STUDDERT, M. J. Bovine encephalitis herpesvirus. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 23, p. 584, 1989.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

THIELSCHER, H.; HUTH, F. W. IBR/IPV: Vaccination or Culling? **Landbauforschung Völkenrode**, v. 36, p. 171-176, 1986.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 169-190, 2006.

TRAESEL, C. K.; SILVA, M. S.; WEISS, M.; SPILKI, F. R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Genetic diversity of 3' region of glycoprotein D gene of bovine herpesvirus 1 and 5. **Virus Genes**, v. 48, n. 3, p. 438-447.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; HUGHES, G.; BABIUK, L. A. The role of carbohydrate in the antigenic and immunogenic structure of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIV. **The Journal of General Virology**, v. 71, n. 9, p. 2053-2063, 1990.

VAN OIRSCHOT, J. T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **The Veterinary Quarterly**, v. 17, n. 1, p. 29-33, 1995.

VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. M. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, 1996.

VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137, 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 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

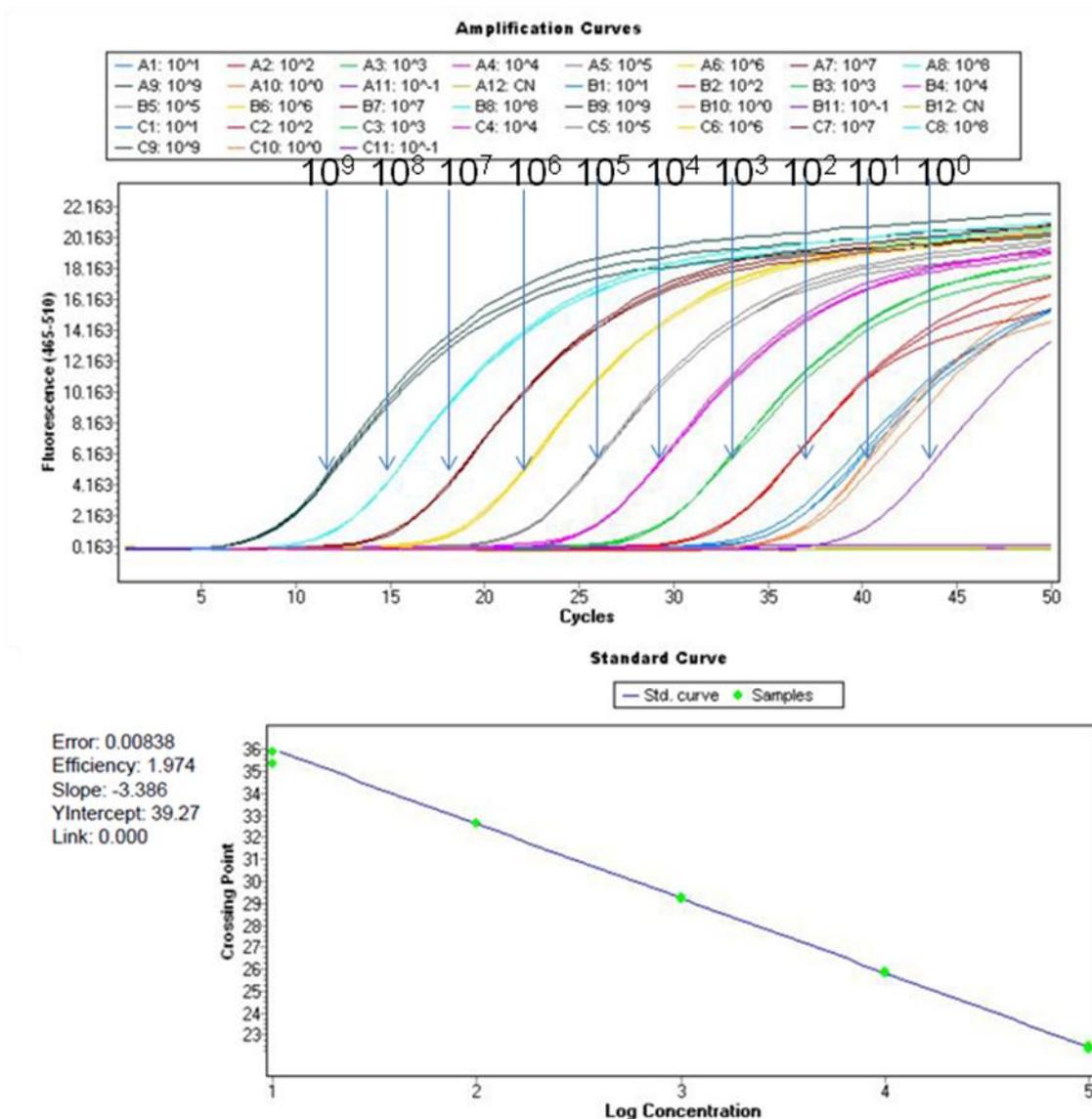
VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MORAES, M. P.; BRAGANÇA, J. F. M. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvírus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3-4, p. 185-196, 2004.

WILD, P.; SCHRANER, E. M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvírus 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9561-9566, 1998.

WYLER, R.; ENGLES, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BoHV-5). In: WITTMAN, G., **Herpesvirus Disease of Cattle, Horses and Pigs**. Boston: Kluwer Academic, 1989. p. 1-72.

## 8. APÊNDICES

**APÊNDICE A – Curva padrão para o BoHV-1 realizada em ensaio de qPCR *monoplex* e concentração dos reagentes utilizando a mesma ciclagem descrita no Quadro 13.**

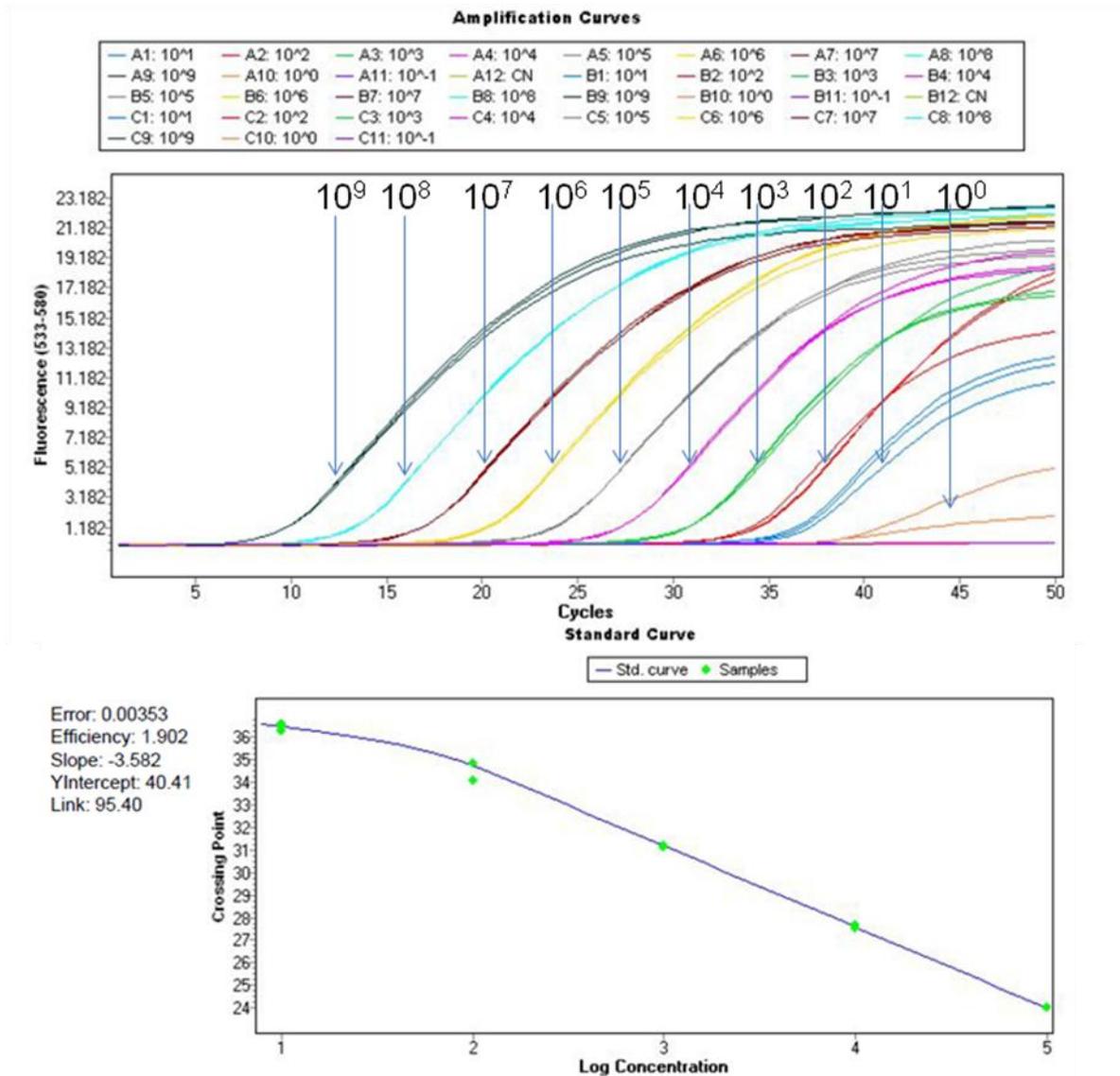


Reagentes	Volume para uma amostra ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final
LightCycler® 480 Probes Master	12,5	1X
Primer senso BoHV-1 a 50 $\mu\text{M}$	0,4	0,8 $\mu\text{M}$
Primer antisenso BoHV-1 a 50 $\mu\text{M}$	0,4	0,8 $\mu\text{M}$
Sonda BoHV-1 a 10 $\mu\text{M}$	0,5	0,2 $\mu\text{M}$
Água livre de nucleases	5,2	---
DNA	6,0	
Volume total	25	

**APÊNDICE B – Comparativo dos valores de Cq e média da concentração obtidos ao realizar o ensaio de qPCR *monoplex* com a qPCR *multiplex* para o BoHV-1.**

Cópias de DNA/ $\mu$ L	Média Cq <i>monoplex</i>	Média da Concentração <i>monoplex</i>	Média Cq <i>multiplex</i>	Média da Concentração <i>multiplex</i>
$10^0$	37,06	$4,85 \times 10^0$	37,82	$3,45 \times 10^0$
$10^0$	36,82	$5,72 \times 10^0$	37,31	$4,59 \times 10^0$
$10^0$	36,92	$5,33 \times 10^0$	36,72	$6,42 \times 10^0$
$10^1$	35,34	$1,57 \times 10^1$	35,82	$1,09 \times 10^1$
$10^1$	35,88	$1,08 \times 10^1$	35,96	$1,00 \times 10^1$
$10^1$	35,86	$1,10 \times 10^1$	36,04	$9,50 \times 10^0$
$10^2$	32,61	$1,00 \times 10^2$	32,10	$1,21 \times 10^2$
$10^2$	32,63	$9,85 \times 10^1$	32,32	$1,04 \times 10^2$
$10^2$	32,62	$9,96 \times 10^1$	32,06	$1,25 \times 10^2$
$10^3$	29,17	$1,04 \times 10^3$	29,34	$8,40 \times 10^2$
$10^3$	29,22	$1,00 \times 10^3$	29,39	$8,13 \times 10^2$
$10^3$	29,27	$9,69 \times 10^2$	29,46	$7,73 \times 10^2$
$10^4$	25,82	$1,01 \times 10^4$	25,88	$9,52 \times 10^3$
$10^4$	25,83	$1,01 \times 10^4$	25,90	$9,38 \times 10^3$
$10^4$	25,87	$9,83 \times 10^3$	25,94	$9,13 \times 10^3$
$10^5$	22,36	$1,07 \times 10^5$	22,36	$1,12 \times 10^5$
$10^5$	22,46	$9,94 \times 10^4$	22,53	$9,91 \times 10^4$
$10^5$	22,46	$9,92 \times 10^4$	22,51	$1,01 \times 10^5$
$10^6$	19,01	$1,04 \times 10^6$	19,17	$1,05 \times 10^6$
$10^6$	19,04	$1,02 \times 10^6$	19,13	$1,07 \times 10^6$
$10^6$	19,11	$9,71 \times 10^5$	19,14	$1,07 \times 10^6$

**APÊNDICE C – Curva padrão para o BoHV-5 realizada em ensaio de qPCR monoplex e concentração dos reagentes utilizando a mesma ciclagem descrita no Quadro 13.**



Reagentes	Volume para uma amostra (µL)	Concentração final
LightCycler® 480 Probes Master	12,5	1X
Primer senso BoHV-5 a 50 µM	0,4	0,8 µM
Primer antisenso BoHV-5 a 50 µM	0,4	0,8 µM
Sonda BoHV-5 a 10 µM	0,5	0,2 µM
Água livre de nucleases	5,2	---
DNA	6,0	
Volume total	25	

**APÊNDICE D – Comparativo dos valores de Cq e média da concentração obtidos ao realizar o ensaio de qPCR *monoplex* com a qPCR *multiplex* para o BoHV-5.**

CÓPIAS DE DNA/ $\mu$ L	Média Cq <i>monoplex</i>	Média da Concentração <i>monoplex</i>	Média Cq <i>multiplex</i>	Média da Concentração <i>multiplex</i>
$10^0$	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
$10^0$	38,87	$5,07 \times 10^{-3}$	38,30	$1,90 \times 10^{-1}$
$10^0$	37,05	$2,44 \times 10^0$	37,57	$1,01 \times 10^0$
$10^1$	36,56	$7,89 \times 10^0$	36,33	$1,00 \times 10^1$
$10^1$	36,45	$1,00 \times 10^1$	37,71	$2,44 \times 10^1$
$10^1$	36,27	$1,43 \times 10^1$	35,73	$2,40 \times 10^1$
$10^2$	34,82	$9,54 \times 10^1$	34,21	$1,10 \times 10^2$
$10^2$	34,78	$9,78 \times 10^1$	34,22	$1,09 \times 10^2$
$10^2$	34,04	$1,57 \times 10^2$	33,98	$1,28 \times 10^2$
$10^3$	31,20	$9,81 \times 10^2$	31,04	$9,12 \times 10^2$
$10^3$	31,12	$1,03 \times 10^3$	30,76	$1,11 \times 10^3$
$10^3$	31,10	$1,04 \times 10^3$	31,02	$9,27 \times 10^2$
$10^4$	27,67	$9,47 \times 10^3$	27,77	$8,14 \times 10^3$
$10^4$	27,58	$1,00 \times 10^4$	27,55	$9,47 \times 10^3$
$10^4$	27,56	$1,02 \times 10^4$	27,53	$9,59 \times 10^3$
$10^5$	24,03	$9,80 \times 10^4$	24,14	$9,24 \times 10^4$
$10^5$	24,02	$9,87 \times 10^4$	24,03	$9,94 \times 10^4$
$10^5$	24,02	$9,89 \times 10^4$	24,06	$9,80 \times 10^4$
$10^6$	20,59	$8,94 \times 10^5$	20,50	$1,06 \times 10^6$
$10^6$	20,58	$9,04 \times 10^5$	20,62	$9,76 \times 10^5$
$10^6$	20,54	$9,26 \times 10^5$	20,43	$1,11 \times 10^6$

**APÊNDICE E – Dados dos animais positivos enviados na ficha de requisição de exames.**

ANO	TA	LVB	MUNICÍPIO / ESTADO	RAÇA, TIPO DE CRIAÇÃO, EXPLORAÇÃO	SEXO	IDADE (MESES)	DATA DA COLHEITA AMOSTRA	INÍCIO DO FOCO	NOTIFICAÇÃO	DATA DO ÓBITO	ENVIO AO LAB
2012	616	7866	SÍTIO DOURADINHO - SÃO JOÃO DA BOA VISTA - SP	SRD	NI	12	NI	NI	NI	09/03/2012	NI
2012	1193	15375	FAZENDA SANTO AGOSTINHO - MONTE ALTO - SP	SRD	M	ENTRE 12 E 24	19/05/2012	13/05/2012	21/05/2012	19/05/2012	23/05/2012
2012	1350	17176	SÍTIO SÃO JORGE - SÃO ROQUE - SP	NELORE	M	20	04/05/2012	NI	NI	NI	NI
2012	2266	26119	SÍTIO QUEIXADA - TAIACU - SP	MESTIÇO TABAPUÃ	F	4	NI	NI	NI	NI	NI
2012	2793	30348	SÍTIO BOM JARDIM - MARILIA - SP	NELORE	M	12	07/12/2012	04/12/2012	04/12/2012	07/12/2012	11/12/2012
2013	585	5586	ITARARÉ - SP	MESTIÇA	M	8	19/03/2013	NI	NI	NI	NI
2013	889	10299	SÍTIO SANTO ANTONIO - QUINTANA - SP	NELORE	NI	36	04/05/2013	02/05/2013	06/05/2013	04/05/2013	07/05/2013
2014	043	160	BOTUCATU - SP	NI	NI	NI	NI	NI	NI	JANEIRO	NI
2014	043	161	BOTUCATU - SP	NI	NI	NI	NI	NI	NI	JANEIRO	NI

\*NI – Não Informado



**ANEXO B – Nota técnica do caso de EEB ocorrido no Paraná em dezembro de 2012.**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

**Nota Técnica DSA Nº 13 / 2013**

---

**Assunto:** Encefalopatia Espongiforme Bovina no Brasil – Informe Final

**Data:** 18 de fevereiro de 2013.

---

O Brasil notificou o primeiro caso de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) em 7 de dezembro de 2012, logo após a confirmação do diagnóstico pelo laboratório de referência internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) em Weybridge, Reino Unido (AHVLA). O protocolo de notificação seguiu os procedimentos previstos no manual para ocorrência de EEB no Brasil, apresentado à OIE quando da sua classificação como país de risco insignificante para a doença.

O caso de EEB registrado no Brasil refere-se a uma única vaca nativa criada para produção de bezerros para engorda. A vaca morreu com cerca de 13 anos de idade e foi criada em sistemas extensivos ao longo de sua vida, sendo alimentada apenas com forragem e suplementação mineral.

O funcionário da Fazenda Boa Sorte, município de Sertãozinho, Estado do Paraná, observou, durante a vistoria diária dos animais, que havia uma vaca caída. Logo no dia seguinte (domingo), após ter sido informado que o animal havia morrido (< 24 horas da observação anterior), o Serviço Veterinário Estadual se deslocou à fazenda para investigar o ocorrido, quando decidiu colher amostras para o diagnóstico da raiva devido a doença ser endêmica na região.

A carcaça do animal foi devidamente enterrada em uma vala profunda na mesma fazenda onde morreu. Portanto, este animal não representou qualquer risco de contaminação para a cadeia alimentar.

**1. Laboratório e investigação epidemiológica**

Conforme preconizado no protocolo brasileiro para vigilância de síndromes neurológicas, a amostra em questão foi direcionada prioritariamente para diagnóstico da raiva e, posteriormente para diagnósticos diferenciais.

Em 15 de junho de 2012, o Laboratório de Referência Nacional - LANAGRO / PE identificou a primeira marcação priônica em amostra de bovino no Brasil. Logo após essa data, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) iniciou uma série de atividades de campo e laboratoriais para verificar com exatidão as informações prestadas até então, a saber:



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

### 1.1 - Verificação dos procedimentos laboratoriais

As investigações constataram que ocorreu uma sobrecarga momentânea do sistema de diagnóstico das EETs devido a um incêndio na seção de histopatologia em um dos laboratórios credenciados para o diagnóstico das EETs, o que comprometeu parcialmente o fluxo de processamento da amostra com vistas a continuidade do cumprimento do protocolo nacional (figura 1).

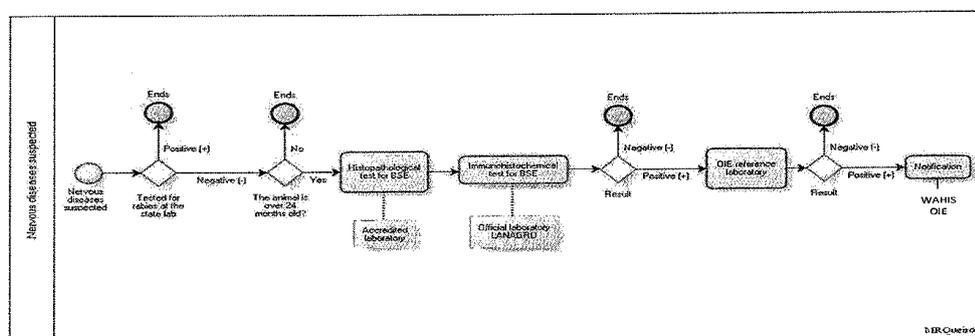


Figura 1 - Fluxo de testes laboratoriais para síndromes nervosa e primeira notificação.

O Mapa adotou providências necessárias para melhorar e agilizar o fluxo de amostras e informações entre os laboratórios da rede de diagnósticos de EETs, como:

- Desenvolvimento e aplicação de um novo sistema informatizado - Sistema de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (SEET), a partir de 1º de janeiro de 2013, com o objetivo principal de facilitar a percepção de eventuais atrasos no processamento e emissão de resultado das amostras;
- Investimento no Lanagro/PE para implantação da técnica de Western Blot;
- Contratação de pessoal para ampliar a capacidade operacional do Lanagro/PE;
- Contratação de patologista para implantação do diagnóstico das EETs no Lanagro/MG;
- Realização de auditorias técnicas nos laboratórios da rede de diagnóstico para as EET de forma mais frequente.

### 1.2 - Investigações de campo

Após a identificação da marcação prionica (Junho/2012), o Mapa enviou veterinários federais para confirmar os procedimentos declarados pelas autoridades sanitárias do Estado do Paraná (ADAPAR) e para investigações adicionais



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

As investigações de campo seguiram o preconizado no ponto 3b, do artigo 11 5 3 do Código Sanitário de Animais Terrestre da OIE, que buscaram identificar os animais nascidos na mesma fazenda que nasceu o caso de EEB, no período de 12 meses antes e após a sua data de nascimento. Entre os itens verificados durante estas investigações, havia a informação inicialmente obtida pela ADAPAR em relação à idade do animal, manejo alimentar e fazendas onde o caso viveu, que foram minuciosamente investigadas, como descrito nos itens abaixo

**1.2.1 - Fazendas onde o caso viveu**

O caso de EEB nasceu entre agosto e dezembro de 1997, na Fazenda Água do Índio, município de Cianorte, Estado do Paraná, pertencente à Companhia de Melhoramento Norte do Paraná – CMNP e foi vendido, juntamente com outros 24 animais, para a Fazenda Santo Antônio, município de Sertãoópolis, no mesmo Estado.

Esse animal permaneceu na primeira propriedade entre 15 a 20 meses de idade, e, na segunda, até sua morte, com idade aproximada de 13 anos. Nas propriedades onde o caso de EEB viveu não foi encontrada qualquer evidência sobre o uso de alimentos potencialmente contaminados ou qualquer outro que leva à suspeita sobre o uso de farinha de carne e osso (FCO) nessas fazendas. Além disso, essa vaca nasceu em 1997, após a proibição do uso de proteína de ruminantes na alimentação de ruminantes no Brasil, que se deu em 1996.

**1.2.1.1 - Fazenda Água do Índio - Cianorte / PR**

A fazenda Água do Índio, local de nascimento do caso da EEB, era utilizada exclusivamente para pecuária de corte, onde os machos foram desmamados e encaminhados para engorda em outras fazendas do grupo CMNP, no Estado do Paraná. As fêmeas eram utilizadas principalmente como reposição para todas as fazendas do grupo, sendo uma parcela vendida para fazendas não pertencentes a CMNP, com idade máxima de 36 meses.

Os animais na Fazenda Água do Índio eram marcados individualmente a ferro quente na perna esquerda com as letras "CMP" e, do lado direito da face, com o mês e o ano de nascimento.

**1.2.1.2 – Fazenda Santo Antônio / Fazenda Boa Sorte - Sertãoópolis / PR**

Em 13 de abril de 1999, o proprietário da fazenda Santo Antonio comprou 25 novilhas, de 15 a 20 meses de idade, da Fazenda Água do Índio em um leilão no município de Londrina, Estado do Paraná.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

Em 2003, devido à morte do proprietário, a fazenda Santo Antonio foi dividida em três propriedades entre os herdeiros: Fazenda Santo Antonio, Fazenda Boa Sorte e Fazenda Vale Verde, sendo o rebanho distribuído entre essas propriedades. Dos 25 animais comprados a partir da Fazenda Água do Índio, 10 foram encontrados na fazenda Boa Sorte e dois estavam na Fazenda Vale Verde. O caso de EEB foi um dos 10 animais que estavam na Fazenda Boa Sorte.

#### 1.2.2 - Animais de coorte

O manejo da criação de gado de corte do grupo CMNP prevê o descarte (abate) de animais que atingem 10 anos de idade, ou mais cedo que isso no caso de problemas reprodutivos, como definido no Procedimento Operacional criado pela implementação do sistema de certificação ISO 9000 em suas fazendas. Assim, não há bovinos com mais de 10 anos em fazendas do grupo CMNP, razão pela qual não foram encontrados animais coorte do caso de EEB nessas fazendas.

No período de agosto de 1996 a dezembro de 2001, a Fazenda Água do Índio vendeu 4.946 animais para 44 propriedades que não pertencem ao grupo CMNP. Desses, 4.751 animais foram encaminhados à 43 propriedades localizadas em 31 municípios do Estado do Paraná, sendo o restante (195 animais) enviados para uma fazenda localizada no município de Paranhos, Estado de Mato Grosso do Sul. Todos os 4.946 animais foram criados para fins de reprodução.

Os animais coorte foram rastreados em todas as 44 propriedades, sendo encontrados 11 animais vivos com idade superior a 15 anos e que apresentavam bom estado de saúde. Como descrito acima, nove animais estavam na fazenda Boa Sorte e dois na Fazenda Vale Verde.

Primeiramente, todos os animais coortes localizados foram identificados individualmente e mantidos sob a supervisão da ADAPAR. Posteriormente, mesmo estando saudáveis, esses animais foram humanamente sacrificados na propriedade e amostras do cérebro foram colhidas para os testes de EEB, sendo suas carcaças enterradas em vala profunda em lugar apropriado na própria propriedade.

Os testes foram realizados pelo LANAGRO/PE e todas as amostras resultaram negativas.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

### 1.3 - Considerações gerais sobre as investigações

Os resultados das investigações de campo corroboram com informações técnicas existentes sobre o sistema de produção de gado de corte no Brasil, permitindo mencionar algumas considerações relevantes, como se segue:

- A Fazenda Água do Índio pertencia a um grupo empresarial dedicado à agropecuária, entre outras atividades, tendo como principal função a oferta de animais para engorda em outras fazendas do mesmo grupo, bem como a substituição de seu rebanho de criação própria. A mentalidade empresarial de administração dessas propriedades incluiu a certificação ISO 9000, que estabeleceu as diretrizes de manejo de descarte de animais (abate) com mais de 10 anos.

- A Fazenda Boa Sorte onde o caso de EEB viveu a maior parte de sua vida, adota um sistema de produção de carne de ciclo completo. No entanto, a pecuária é uma atividade secundária nesta fazenda, sendo a agricultura a sua principal fonte de renda. Neste sentido, o rebanho é pequeno e o manejo inclui a inspeção diária do rebanho para verificar partos, abortos, animais doentes, especialmente quando se tem no rebanho vacas com idade avançada, como era o caso. Esse tipo de manejo permitiria a identificação de qualquer outro caso de EEB se eventualmente ele tivesse ocorrido, o que não ocorreu.

- As fazendas envolvidas na presente investigação foram classificadas em um sistema onde a alimentação era a pasto e suplementação mineral. Este é o sistema criação de aproximadamente 95% do rebanho bovino de corte no Brasil, sendo considerado refratário à ocorrência da EEB típica.

- O número de animais coorte vivos detectados nas investigações era o esperado tendo em vista a idade avançada que estes animais teriam hoje (superior a 15 anos). A existência de animais com essa idade avançada não é característica do sistema brasileiro de produção de carne bovina.

### 2. Sistema de Vigilância

Desde 1997, a vigilância para EEB foi incorporada ao sistema de vigilância da raiva dos herbívoros, doença nervosa endêmica em parte do território brasileiro. A partir de então, a suspeita ou a ocorrência de doenças nervosas em herbívoros passou a ser de notificação obrigatória e as EET foram incluídas na lista de doenças passíveis de adoção de medidas de defesa sanitária animal.

Os procedimentos de vigilância adotados pelo Brasil para a prevenção da EEB seguem os padrões da OIE, como definido no capítulo 11.5 do Código Sanitário para Animais Terrestres (Código Terrestre). Esse modelo foi delineado para encontrar um caso de EEB com



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

95% de confiança, considerando aspectos que tem influência na manifestação da doença como aspectos demográficos da população bovina, sensibilidade dos testes e total e testes realizados nas sub-populações de risco. Todos esses aspectos são expressos através de "pontos de vigilância" a serem alcançados pelos países, os quais estão definidos na Tabela 1 do artigo 11.5.21 do Código Terrestre. Essa tabela estratifica os pontos de vigilância de acordo com o tamanho da população e o tipo de vigilância.

Diante disso, para definição de tamanho de amostra e prevalência esperada, o Brasil se enquadra na categoria "Países com população bovina adulta (>24 meses) acima de 1 000 000 de cabeças", como definido pela tabela 1 do Artigo 11.5.21 do Código Terrestre. Países incluídos nessa categoria devem alcançar 150 000 pontos de vigilância para serem reconhecidos como país de risco insignificante para EEB. O Brasil, contudo, alcançou mais de dois milhões de pontos quando foi reconhecido pela OIE como país de risco insignificante para EEB em maio de 2012, ou seja, mais de 15 vezes o total de pontos exigido para a sua categoria.

O Brasil realiza a vigilância para EEB em todas as quatro sub-populações descritas pelo Código Terrestre, assim como em todas as categorias de idade.

### 3. Medidas de mitigação de risco

Desde 1990, o MAPA aplica medidas preventivas para evitar a ocorrência da EEB, que têm sido constantemente atualizados de acordo com a informação científica disponível e as recomendações do Código Terrestre da OIE.

É importante ressaltar que todas as medidas de mitigação de risco que o Brasil informou à OIE, e que resultaram no reconhecimento do País na categoria de risco insignificante para EEB, continuam totalmente operacionais, a saber:

- Controle da importação de bovinos, de seus produtos e subprodutos, para evitar a entrada do agente da EEB;
- Controle da alimentação de ruminantes, para evitar a transmissão do agente, caso esteja presente;
- Remoção do material potencialmente de risco nos frigoríficos, tais como medula, cérebro, íleo distal, olhos e amígdalas, que são destruídos e não são enviados às graxarias;
- Esterilização da FCO (a 133°C, 20', 3 bar), para reduzir a infectividade do agente, caso esteja presente;
- Vigilância direcionada para detecção precoce da doença, no sentido de verificar a eficiência das medidas de prevenção e de mitigação de risco;



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

- Educação sanitária e atualização técnica para contínuo treinamento de profissionais envolvidos nos diversos segmentos dessa política sanitária, seja do setor oficial ou privado, além de constante elaboração e divulgação de material técnico pertinente

#### 4. Considerações Finais

O Brasil foi reconhecido pela OIE, considerando a aprovação por unanimidade pela Assembléia Mundial dos Delegados, como país com risco insignificante para a EEB durante a sua 80ª Sessão Geral, realizada em Maio de 2012, devido ao pleno atendimento dos critérios estabelecidos pelo Código Terrestre, que continuam em plena vigência

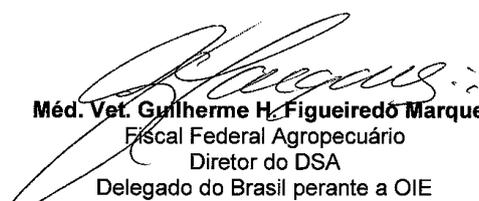
O Brasil entende que a ocorrência deste caso isolado de EEB não está relacionada com falhas nos procedimentos de mitigação de risco existentes, pois vem mantendo todas as medidas discrias anteriormente e por tratar-se de um animal com idade superior a 11 anos

Por considerar que a situação epidemiológica do Brasil não foi alterada pelo registro deste caso de EEB, a Comissão Científica de Doenças Animais da OIE, em reunião realizada recentemente (4 a 8 de fevereiro de 2013), analisou e discutiu o caso brasileiro, concluindo com a manutenção da classificação do Brasil como país de risco insignificante para a EEB

Considerando as informações supracitadas, os resultados das investigações epidemiológicas conduzidas pelo Serviço Veterinário Brasileiro e o relatório emitido pelo AHVLA afirmando que "Apesar da baixa qualidade e do histórico de fixação indeterminado da amostra comprometerem a interpretação, mesmo assim nós notamos que a amostra apresenta ter algumas características do tipo-H e não dos tipos L ou C", o Serviço Veterinário Brasileiro acredita que esse foi um caso de EEB atípica (raro e espontâneo).

É importante destacar que este animal não entrou na cadeia de processamento de carnes, tendo sido enterrado na fazenda onde morreu; por causa disso, não representou qualquer risco de contaminação

Diante desses resultados, o Departamento de Saúde Animal/SDA/Mapa considera a investigação sobre o caso de EEB no Brasil encerrada, conforme descrito no Informe Final enviado aos países por meio do Sistema Mundial de Informação Sanitária (WAHIS) da OIE

  
**Méd. Vet. Guilherme H. Figueiredo Marques**  
Fiscal Federal Agropecuário  
Diretor do DSA  
Delegado do Brasil perante a OIE

## ANEXO C – Nota técnica do caso de EEB ocorrido no Mato Grosso em maio de 2014.



Bovine spongiform encephalopathy,  
Brazil

Print  
Close

Information received on 02/05/2014 from Dr Figueiredo Marques Guilherme Henrique , Director, Departamento de Saúde Animal , Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento , Brasília, Brazil

### Summary

Report type	Immediate notification (Final report)
Date of start of the event	19/03/2014
Date of pre-confirmation of the event	14/04/2014
Report date	02/05/2014
Date submitted to OIE	02/05/2014
Date event resolved	01/05/2014
Reason for notification	Reoccurrence of a listed disease
Date of previous occurrence	19/12/2010
Manifestation of disease	Sub-clinical infection
Causal agent	Prion
Nature of diagnosis	Laboratory (advanced)
This event pertains to	the whole country

### New outbreaks (1)

Outbreak 1	Porto Esperidião, MATO GROSSO					
Date of start of the outbreak	19/03/2014					
Outbreak status	Resolved (01/05/2014)					
Epidemiological unit	Farm					
Affected animals	Species	Susceptible	Cases	Deaths	Destroyed	Slaughtered
	Cattle	1177	1	0	50	0
	Buffaloes	11	0	0	0	0
Affected population	A 12-year-old female bovine tested during emergency slaughter at the slaughterhouse. The animal was born and raised on a full-cycle beef farm on extensive grazing, with a population of 1,177 cattle and 11 buffaloes.					

Summary of outbreaks	Total outbreaks: 1					
Total animals affected	Species	Susceptible	Cases	Deaths	Destroyed	Slaughtered
	Cattle	1177	1	0	50	0
	Buffaloes	11	0	0	0	0
Outbreak statistics	Species	Apparent morbidity rate	Apparent mortality rate	Apparent case fatality rate	Proportion susceptible animals lost*	
	Cattle	0.08%	0.00%	0.00%	4.25%	
	Buffaloes	0.00%	0.00%	-	0.00%	

\*Removed from the susceptible population through death, destruction and/or slaughter

### Epidemiology

Source of the outbreak(s) or origin of infection	Unknown or inconclusive
Epidemiological comments	As part of the Brazilian surveillance system for Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), the prion marker was identified on 14 April 2014 in a 12-year-old female bovine sent for emergency slaughter because she was found fallen at her arrival at the slaughterhouse following some problems during transport. The animal was born and raised in the same full-cycle beef farm on extensive grazing. Meat and other products from this animal did not enter the food chain and there was no risk for human population. Tracing back animal movements since 2000, it was established that some animals from the birth cohort of this animal had been moved to 10 other properties in 3 municipalities in the state of Mato Grosso. During the epidemiological investigation, 49 animals from the cohort, which did not show clinical signs of the disease, were destroyed. Samples of nervous tissue were taken from the cohort animals and tested for BSE at the National Laboratory and all were negative on 1 May 2014. All control measures according to the OIE Terrestrial Animal Health Code have already been applied in order to close the outbreak and only the results of the typing tests carried out at the Reference Laboratory at Weybridge (United Kingdom) are pending.

### Control measures

Measures applied	Quarantine Screening Modified stamping out No vaccination No treatment of affected animals
Measures to be applied	No other measures

### Diagnostic test results

Laboratory name and type	Species	Test	Test date	Result
National Agricultural Laboratory (LANAGRO/PE) (National laboratory)	Cattle	immunohistochemical test	14/04/2014	Positive
National Agricultural Laboratory (LANAGRO/PE) (National laboratory)	Cattle	immunohistochemical test	01/05/2014	Negative
Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), Weybridge, United Kingdom (OIE's Reference Laboratory)	Cattle	immunohistochemical test	01/05/2014	Positive

### Future Reporting

The event is resolved. No more reports will be submitted.
-----------------------------------------------------------

### Map of outbreak locations



**ANEXO D – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (frente e verso).**


SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 55/08 sobre o Projeto: “Diagnóstico laboratorial de enfermidades provocadas pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) em amostras provenientes de animais suspeitos, encaminhadas ao serviço de rotina diagnóstica do LVB do Instituto Biológico/APTA”, sob a responsabilidade de **Edviges Maristela Pituco**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo inicialmente aprovado pela CETEA-IB em 25 de julho de 2008 e renovado em 28 de julho de 2010 e em 22 de agosto de 2012.

São Paulo, 22 de agosto de 2012.

  
**Ricardo Spacagna Jordão**  
Coordenador da CETEA-IB

**CETEA - IB**

Registro  
Número : 55.08  
Livro : 01  
Folha : 55  
Data: 22/08/12