

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS BOVINO EM ENCÉFALOS DE
BOVINOS SUBMETIDOS AO DIAGNÓSTICO DE RAIVA**

Hiran Castagnino Kunert Filho

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS BOVINO EM ENCÉFALOS DE
BOVINOS SUBMETIDOS AO DIGNÓSTICO DE RAIVA**

Hiran Castagnino Kunert Filho

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva – Virologia Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

**Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia
Franco**

Porto Alegre

2011

K95d Kunert Filho, Hiran Castagnino
Detecção de DNA de Herpesvírus bovino em
encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva. /
Hiran Castagnino Kunert Filho - Porto Alegre: UFRGS,
2011.

78 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2011. Paulo Michel Roehe, Orient. ;
Ana Claudia Franco, Co-Orient.

1.Encefalites 2. Herpesvírus bovino 3. Virologia
veterinária 4. Raiva I. Roehe, Paulo Michel, Orient. II.
Franco, Ana Claudia, Co-Orient. III.Título.

CDD 616.019

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

Hiran Castagnino Kunert Filho

**TÍTULO DO TRABALHO: DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS BOVINO
EM ENCÉFALOS BOVINOS SUBMETIDOS AO DIAGNÓSTICO DE RAIVA.**

Aprovado em 18 de fevereiro de 2011.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe
Orientador e Presidente da Comissão

Dr^a. Alessandra D'Ávila da Silva (CNPSA/EMBRAPA-Concórdia)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti (UFRGS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal (UFRGS)
Membro da Comissão

**Dedico este trabalho a todos que me apoiaram
e colaboraram com sua realização.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Hiran e Márcia, por acreditarem no meu ideal e incentivarem mais esta etapa de minha vida.

Ao meu irmão, Felipe, que me ajudou, incentivou e apoiou o tempo todo.

Um agradecimento especial aos meus amigos e colegas de laboratório que participaram, acreditaram e puderam compartilhar esse momento comigo. Em especial: Fabrício, Esmale, Helena (Dadá), Luciana, Martha, Helton e Diógenes.

A Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Franco, por toda atenção, paciência e ensinamentos prestados durante a redação dos artigos e dissertação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Michel Roehle, exemplo de dedicação à pesquisa e ensino em Medicina Veterinária. Agradeço imensamente a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação prestada e por me ensinar virologia.

Aos integrantes da virologia do IPVDF, em especial: Alexander Cenci, José Carlos Ferreira (Zeca) e Remo Campagnolo, vocês foram de suma importância no desenvolver desse trabalho.

A Deus por permitir que eu conseguisse concluir mais uma etapa em minha vida e proporcionado o convívio com esse grupo.

“Reunir-se é um começo, permanecer juntos é um progresso e trabalhar juntos é um sucesso.”

Henry Ford

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfologia do herpesvírus bovino tipo 5.....	18
Figura 2. Organização do genoma de BoHV-1.....	19
Figura 3. Etapa inicial da replicação viral.....	21
Figura 4. Microscopia eletrônica da montagem e egresso do herpes simplex humano.....	23
Figura 5. Esquema de montagem dos herpesvírus.....	24
Figura 6. Esquema representativo do vírus rábico.....	33
Figura 7. Imunofluorescência positiva para raiva.....	38

LISTA DE ABREVIACÕES

- BEHV: Herpesvírus da encefalite bovina
BICP: *Bovine Infected Cell Protein*
BLHV: Herpesvírus bovino linfotrópico
BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-2: Herpesvírus bovino tipo 2
BoHV-4: Herpesvírus bovino tipo 4
BoHV-5: Herpesvírus bovino tipo 5
BoHV-6: Hepresvírus bovino tipo 6
BoHVs: Herpesvírus bovinos
BSE: Encefalopatia espongiforme bovina
DNA: Ácido desoxirribonucléico
ECP: Efeito citopático
EUA: Estados Unidos da América
ed: edição
gB: glicoproteína B
gC: glicoproteína C
gD: glicoproteína D
gE: glicoproteína E
gH: glicoproteína H
gI: glicoproteína I
gK: glicoproteína K
gL: glicoproteína L
gM: glicoproteína M
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina
ICTV: *International Committee of Taxonomy of Viruses*
IE: *Immediate early*
IFD: Imunofluorescência direta
IN: Intra-nasal
IPB: Balanopostite pustular infecciosa
IPV: Vulvovaginite pustular infecciosa
IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

IR: Repetição interna
IT: intra-tecal
kpb: kilopares de base
LAT: Transcritos associados à latência
LTR: *Latency-related transcript*
M: Proteína da matriz
MDBK: *Madin-Darby bovine kidney*
MNE: Membrana nuclear externa
MNI: Membrana nuclear interna
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro
N: Nucleoproteína
nm: nanômetros
nPCR: nested Polimerase chain reaction
P: Fosfoproteína
PCR: Polimerase chain reaction
PG: Protocolo geral
p: página
RNA: Ácido ribonucléico
RNP: Ribonucleoproteína
SN: Soro-neutralização
SNC: Sistema nervoso central
TR: Repetição terminal
UL: Região longa
US: Região curta
vCJD: Variante de Creutzfeldt-Jakob
VP: *Virion protein*
VR: Vírus da raiva
v: volume
WHO: World health organization
 α -TIF: *Trans-inducing factor*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIACÕES	8
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 HERPESVÍRUS BOVINO	17
2.1.1 Genoma	18
2.1.2 Replicação viral	19
2.1.3 Latência	24
2.1.4 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	25
2.1.5 Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)	26
2.1.6 Transmissão e epidemiologia	27
2.1.7 Patogenia	29
2.1.8 Encefalite e meningoencefalite	30
2.2 VÍRUS DA RAIVA	32
2.2.1 Epidemiologia	33
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	35
2.3.1 Diagnóstico de BoHV-1 e BoHV-5	35
2.3.1.1 Isolamento viral	35
2.3.1.2 Diagnóstico molecular	36
2.3.2 Diagnóstico de raiva	37
2.3.2.1 Imunofluorescência direta	37
2.3.2.2 Prova biológica – inoculação em camundongos	38
2.4 OBJETIVOS	38

CAPÍTULO 1	39
ISOLATION AND PCR DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUSES IN BRAIN TISSUES OF CATTLE SUBMITTED TO RABIES DIAGNOSIS	40
3. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	71

RESUMO

Os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são alfa herpesvírus freqüentemente associados a meningoencefalites. Por outro lado, o vírus da raiva é o agente mais frequentemente identificado como causador de encefalites virais em bovinos no Brasil. O objetivo do presente estudo foi examinar a ocorrência de infecções por BoHV-1 e/ou BoHV-5 em amostras de tecido encefálico bovino submetidas ao diagnóstico de raiva e avaliar seu possível envolvimento nos quadros de encefalite que originaram a suspeita de raiva. Para tanto, 101 amostras desses tecidos, sendo 39 positivas para raiva e 62 negativas, recebidas pelo órgão oficial responsável pelo diagnóstico de raiva no Estado do Rio Grande do Sul (IPVDF) no período de 2009-2010, foram submetidas a exames buscando o isolamento viral e amplificação de genomas de herpesvírus bovinos. Ao isolamento viral, todas as amostras foram negativas para vírus infeccioso após a realização de três passagens cegas em células MDBK. As mesmas foram submetidas à amplificação por “nested PCR” (nPCR) para a pesquisa de genomas de BoHV-1 e BoHV-5. Das 101 amostras totais analisadas esta técnica revelou que 25,7% (26/101) continham genomas de BoHV-1 e 21,8% (22/101) continham genomas de BoHV-5. Genomas de ambos os tipos foram identificadas em 30 (29,7%) amostras. Entre as amostras que foram também positivas para raiva em 23% (9/39) foram detectados genomas de BoHV-1 e em 15,4% (6/39) continham genomas de BoHV-5. Em 16 destas 39 amostras (41%) foram detectados genomas de BoHV-1 e BoHV-5. Em contrapartida, nas amostras negativas para o vírus rábico, 27,4% (17/62) também foram positivas para BoHV-1, 25,8% (16/62) foram positivas para BoHV-5. Detectaram-se os genomas de ambos BoHV-1 e BoHV-5 em 22,6% (14/62) dos animais. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas, indicando não haver correlação entre a ocorrência de raiva e infecções por herpesvírus na amostragem realizada. Estes resultados indicam que, embora as infecções por BoHV-1 e BoHV-5 tenham apresentado elevada incidência nessas amostras, não havia vírus infeccioso nas mesmas, sugerindo infecções latentes sem envolvimento aparente nos quadros de encefalite que originaram a suspeita inicial de raiva.

PALAVRAS CHAVE: Encefalites; herpesvírus bovino; BoHV-1; BoHV-5; raiva; PCR;

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are alphaherpesviruses associated with a number of clinical manifestations in cattle, including encephalitis. On the other hand, rabies virus is the agent most frequently identified as cause of viral encephalitis in cattle in Brazil. The aim of this study was to examine the occurrence of BoHV-1 and / or BoHV-5 in bovine brain tissue samples submitted to rabies diagnosis. The search was carried out by virus isolation and nested polymerase chain reaction (PCR) in brain tissues of cattle submitted to rabies diagnosis in the state of Rio Grande do Sul in the period 2009-2010. One hundred and one brain samples from cattle with signs of neurological disease, of which 39 were positive and 62 negative for rabies, were used in this study. At virus isolation, all samples were negative for the presence of infectious herpesviruses after three successive passages in MDBK cells. Of the 101 total samples analyzed, this test revealed that 25.7% (26/101) of cattle were infected with BoHV-1 and 21.8% (22/101) were infected with BoHV-5. Genomes of both types were detected in 29.7% (30/101) samples. With the 39 samples positive for rabies virus, BoHV-1 genome was detected in 23% (9/39) and 15.4% (6/39) were positive for BoHV-5 as well as in 41% (16/39) of these samples, which were positive for both BoHVs. On the other hand, the negative samples for rabies virus, 27.4% (17/62) also were positive for BoHV-1, as well and 25.8% (16/62) were positive for BoHV-5. Genomes of both BoHVs were detected in 22.6% (14/62) of the specimens. These differences were not statistically significant indicating no correlation between the occurrence of rabies and herpesvirus infections in the animals. These results do not imply that the herpesviruses detected, even showing a high incidence, were the causative agents of meningoencephalitis in the samples tested, once it was not possible to isolate virus in its infectious form, however it suggests a latent infection in the animals involved with neurological signs of meningoencephalitis whose primary suspicion was rabies.

KEYWORDS: Encephalitis; bovine herpesvirus; BoHV-1; BoHV-5; rabies; PCR;

1. INTRODUÇÃO

As doenças que causam distúrbios neurológicos em bovinos podem ser responsáveis por perdas econômicas significativas (RADOSTITIS *et al.*, 2000). Especialmente nas últimas duas décadas, particularmente em função do reconhecimento da origem zoonótica da doença de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD) e sua relação com a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), a importância das doenças do sistema nervoso de bovinos extrapolou a esfera econômica e alcançou um patamar de significância sem precedentes face ao risco iminente à saúde pública (BARROS *et al.*, 2006). Em consequência disso, as demais enfermidades que afetam o SNC de bovinos cresceram igualmente em importância pela necessidade de metodologia que leve a um diagnóstico diferencial mais preciso.

No Brasil, apesar de até o momento não haver sido identificada a BSE, o diagnóstico diferencial de encefalites traz mais um componente econômico importantíssimo: como grande exportador mundial de carnes, a qualidade sanitária dos rebanhos deve satisfazer as exigências dos mercados importadores. Como tal, a disponibilidade de um sistema eficaz para o diagnóstico diferencial de encefalites é fundamental.

Apesar disso, a maior parte das encefalites em bovinos permanece sem um diagnóstico causal definido. Evidentemente, o estabelecimento da etiologia é complicado pelo grande número de possíveis causas de problemas desse tipo, incluindo intoxicações, causas metabólicas, carenciais ou infecciosas (LEMOS *et al.*, 1998; RADOSTITIS *et al.*, 2000).

Em nosso País, dentre as encefalites ou meningoencefalites em que tem sido possível determinar a possível etiologia, as principais são aquelas causadas por vírus, destacando-se entre elas a raiva (MAPA, 2005) e as infecções por herpesvírus bovinos, (SANCHES *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2008).

O vírus da raiva (VR) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. A maioria das infecções pelo vírus rábico se dá por transmissão percutânea, através da mordedura de animais infectados. Os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais reservatórios do vírus no Brasil, sendo os principais transmissores da infecção a bovinos (BATISTA *et al.*, 2007).

A apresentação clínica da raiva é muito variada na grande maioria das espécies atingidas. As apresentações clássicas da doença são a forma paralítica e furiosa

(BATISTA *et al.*, 2007). A forma parálitica é mais comum em bovinos, conseqüente a lesões na medula, tronco encefálico e cerebelo (REBHUN, 2000).

A raiva bovina tem sido responsabilizada por perdas anuais mundiais de cerca de 50 milhões de dólares (KING & TURNER, 1993). No Brasil, a raiva é a principal doença inflamatória de origem viral do sistema nervoso de bovinos, devido ao seu caráter zoonótico e pelo índice elevado de ocorrência em levantamentos realizados em animais que morreram com sintomatologia nervosa (SANCHES *et al.*, 2000; UBIALI *et al.*, 2007).

Já os herpesvírus bovinos têm sido implicados em encefalites com freqüência crescente, especialmente na Argentina e Brasil (CARRILLO *et al.*, 1983; WEIBLEN *et al.*, 1989; RISSI *et al.*, 2006). No Brasil, um estudo apontou os BoHVs como a segunda mais freqüente causa infecciosa de encefalites/meningoencefalites em bovinos (SANCHES *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas de encefalites por herpesvírus bovinos têm sido mais freqüentemente detectadas em bovinos jovens e, esporadicamente, em animais adultos submetidos a fatores estressantes (RISSI, *et al.*, 2007).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) está associado a uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo quadros respiratórios e reprodutivos (RIET-CORREA, 1989; ROEHE *et al.*, 1997) e, mais raramente, meningoencefalites (ROELS, 2000; PENNY *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2007). O BoHV-1 geralmente causa doença clínica em animais com idade superior a 6 meses, quando a imunidade materna diminui (BENNETT & LJPELAAR, 2003). É responsável por consideráveis perdas econômicas devido à diminuição da produção de leite, perda de peso e abortos (WYLER, *et al.*, 1989).

Por outro lado, o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é considerado um dos principais agentes infecciosos associado a encefalites ou meningoencefalites, e mais raramente relacionado a problemas reprodutivos (BRATANICH, 1991; KIRKLAND *et al.*, 2009). O BoHV-5 é considerado o agente mais freqüentemente detectado em amostras de encéfalos negativas para raiva com quadros neurológicos (PINTO *et al.*, 2000). Até recentemente, amostras de BoHV-5 eram consideradas variantes de BoHV-1, devido às amplas reações cruzadas entre os dois vírus detectadas em testes sorológicos (BRATANICH *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1998).

A apresentação de sintomas muito semelhantes durante o desenvolvimento de doenças neurológicas de bovinos implica em que o diagnóstico definitivo só pode ser

feito com a utilização de técnicas laboratoriais que identificam o agente etiológico da doença (BARROS *et al.*, 2003). Visando a identificação destes agentes, neste estudo buscamos avaliar a ocorrência de BoHV-1 e BoHV-5 em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul. Face a que em muitas ocasiões o vírus pode estar presente em forma não infecciosa, estabelecendo infecções latentes (VOGEL *et al.*, 2003), foram utilizados dois enfoques para avaliar o problema. Para a identificação de vírus infeccioso foram realizadas tentativas de isolamento viral em cultivos celulares; para a pesquisa do genoma viral, foi utilizada uma “nested” PCR, que permite a amplificação do DNA genômico de BoHV1 e BoHV-5.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HERPESVÍRUS BOVINO

Atualmente estão descritos 5 tipos diferentes de herpesvírus bovinos (DAVISON *et al.*, 2009). Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence ao gênero *Varicellovirus* e é o protótipo dos herpesvírus bovinos, é o agente da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite infecciosa (IBP) (MUYLKENS *et al.*, 2007). O BoHV-2 pertence ao gênero *Simplexvirus* e é o principal causador de mamilites herpéticas em bovinos e de uma doença de pele conhecida como “*Pseudolumpy skin disease*” (TORRES *et al.*, 2010). O BoHV-4, diferentemente dos outros vírus pertence à subfamília *Gammaherpesvirinae* e ao gênero *Citomegalovirus* e não está claramente associado a nenhuma doença até o momento (BARTHA *et al.*, 1966). O BoHV-5 é um alfa herpesvírus do gênero *Varicellovirus*, como o BoHV-1, e trata-se de um agente com maior neurovirulência, sendo um dos principais causadores de encefalites herpéticas virais em bovinos (DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2010). O BoHV-6 é um gamma herpesvírus do gênero *Macavirus* e é também conhecido como herpesvírus bovino linfotrópico (BLHV), para o qual não há nenhuma doença relacionada até o momento (BANKS *et al.*, 2008).

Os herpesvírus são membros da ordem *Herpesvirales* (DAVISON *et al.*, 2009), família *Herpesviridae*, a qual inclui mais de 200 vírus isolados de diferentes espécies, incluindo moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (ROIZMAN *et al.*, 2001). A família *Herpesviridae* divide-se em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (KNIPE *et al.*, 2001). Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem como característica um ciclo de replicação curto, uma rápida disseminação em cultivo celular e destruição eficiente das células. Além disso, estabelecem latência em neurônios dos gânglios sensoriais, como o gânglio trigêmeo (FRANCO & ROEHE, 2007).

Os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2010). Os vírions possuem envelope lipídico onde encontram-se glicoproteínas virais dispostas em forma de espículas, sendo as glicoproteínas B, C e D as predominantes; o tegumento é composto de proteínas organizadas em quantidades variáveis, na forma de uma camada assimétrica localizada entre o envelope e o capsídeo (ROIZMAN & PELLET, 2001); e um nucleocapsídeo icosaédrico (Figura 1) formado por 162 capsômeros (THIRY *et al.*,

2007). Os vírions são esféricos a pleomórficos, com diâmetro oscilando entre de 120 a 200 nm (DAVISON *et al.*, 2009).

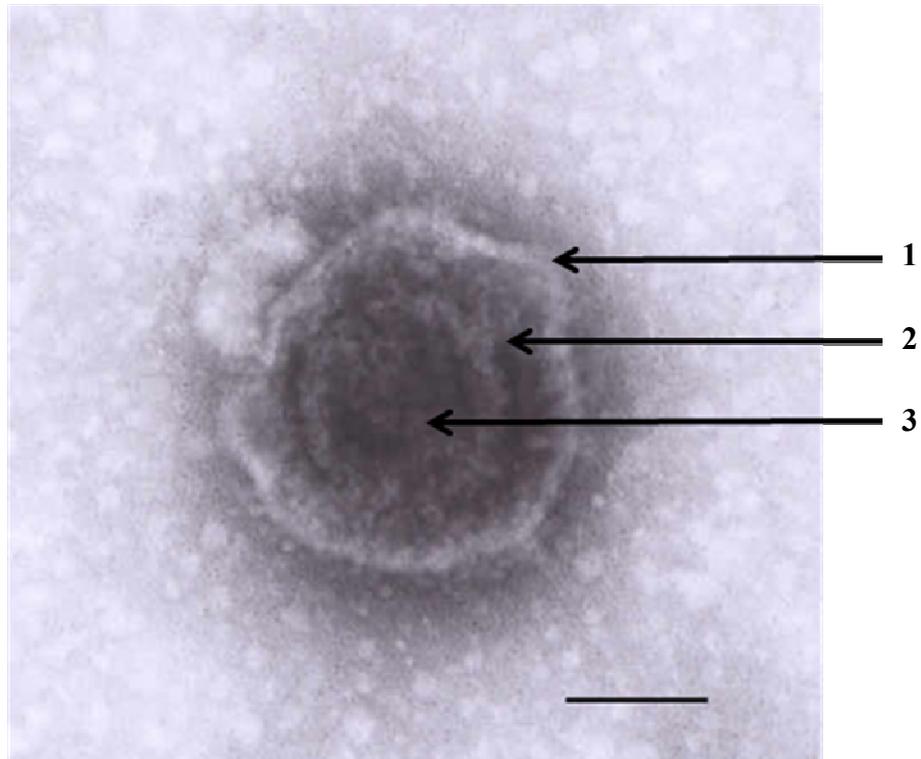


Figura 1: Foto de um vírion do Herpesvírus bovino tipo 5 visualizado por microscopia eletrônica de transmissão com coloração negativa. O diâmetro do vírion é de aproximadamente 260nm. A barra preta indica 100nm. As setas indicam os principais componentes do vírion (1: envelope; 2: tegumento; 3: nucleocapsídeo).

Fonte: DEL MÉDICO ZAJAC, *et al.*, 2010.

2.1.1 Genoma

Os genomas de BoHV-1 e BoHV-5 consistem em uma fita dupla de DNA linear com aproximadamente 136.000 pares de bases (kpb) para o BoHV-1 e 138.390 kpb para o BoHV-5 (DELHON *et al.*, 2003; MUYLKENS *et al.*, 2007). Em torno de 75% desta composição é formada por bases GC (DELHON *et al.*, 2003). O genoma está classificado no grupo “D” dos herpesvírus e pode ser dividido em uma região longa (UL) com aproximadamente de 102 a 104 kpb e uma região curta (US) de 10,5 a 11 kpb. A região US está cercada por regiões repetidas e invertidas de 24 kpb, denominada repetição interna (IR) e repetição terminal (TR) (Figura 2) (ROIZMAN & KNIPE, 2001).

Antes de sua reclassificação como um tipo distinto, amostras de BoHV-5 eram consideradas variantes encefalitogênicas de BoHV-1, sendo então classificadas como subtipo 3 de BoHV-1, ou BoHV-1.3 (ENGELS *et al.*, 1986; METZLER *et al.*, 1986).

Estudos genômicos e antigênicos posteriores demonstraram diferenças importantes entre ambos os vírus (STUDDERT *et al.*, 1985; METZLER *et al.*, 1986; D'OFFAY *et al.*, 1993; PIDONE *et al.*, 1999; D'ARCE *et al.*, 2002). Em consequência disso, a partir de 1992, o BoHV-5 foi reconhecido como um vírus distinto pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ROIZMAN *et al.*, 1992).

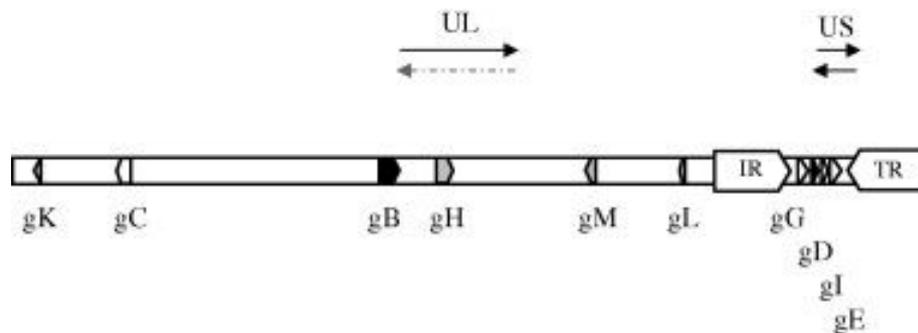


Figura 2: Organização do genoma de BoHV-1 incluindo as duas sequências únicas, uma longa (UL) e uma curta (US). Esta última é flanqueada por duas sequências repetidas e invertidas (uma interna, IR; e outra terminal, TR). A replicação do genoma gera quantidades equimolares das duas principais formas do isômero, que difere por uma relativa orientação dos segmentos US e UL (setas horizontais preenchidas); o segmento UL é predominantemente observado em uma única orientação, mas pode aparecer raramente invertido (seta horizontal tracejada). A localização dos 10 genes que codificam glicoproteínas é indicada pelas cabeças de seta. Adaptado de DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2010.

2.1.2 Replicação viral

A maioria dos experimentos buscando esclarecer o processo de replicação viral foram realizados com base no BoHV-1 (MUYLKENS *et al.*, 2007). Pela similaridade genômica entre BoHV-1 e BoHV-5, assume-se que a replicação de BoHV-5 siga os mesmos princípios, embora estudos referindo-se precisamente à replicação de BoHV-5 sejam ainda limitados. Portanto, ao longo dessa revisão a replicação do BoHV-1 será abordada como modelo, salientando-se, se necessário, diferenças detectadas entre os estágios de replicação de BoHV-1 e BoHV-5.

A rota natural de entrada do BoHV-1 é a membrana da mucosa do trato respiratório superior ou do trato genital (MUYLKENS *et al.*, 2007). O ciclo de replicação do BoHV-1 é iniciado pela interação dos vírions com receptores da membrana plasmática das células-alvo (FRANCO & ROEHE, 2007). Ocorre uma ligação de baixa afinidade entre a gB e/ou gC com as estruturas da superfície celular de sulfato de heparina (Figura 3). A adsorção é mediada por uma interação de alta afinidade entre a gD e co-receptores da membrana plasmática a nectina-1 (pertencente a

superfamília das imunoglobulinas). Essa ligação com os co-receptores é seguida de fusão do envelope viral e penetração sem necessidade de internalização por endocitose e acidificação dos endossomos (Figura 3) (LI *et al.*, 1995; GERAGHTY *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 1999). Neste processo estão envolvidas pelo menos quatro glicoproteínas: gD, gB e o heterodímero formado pela gH e gL (Figura 3) (LIANG *et al.*, 1995; MEYER *et al.*, 1998; GERDTS *et al.*, 2000).

Após a fusão o nucleocapsídeo e as proteínas virais presentes no tegumento são transportados até os poros nucleares da célula - localizados na membrana nuclear - através do complexo motor dineína associado com os microtúbulos da célula infectada (DOHNER *et al.*, 2002). O nucleocapsídeo associa-se aos complexos dos poros nucleares, ocorrendo a sua desintegração e liberação do genoma no interior do núcleo (Figura 3) (FRANCO & ROEHE, 2007). As proteínas que participam deste processo ainda são desconhecidas, e acredita-se que proteínas do tegumento (UL31, UL34) e do capsídeo (VP 26) estejam envolvidas (REYNOLDS *et al.*, 2004; ANTINONE *et al.*, 2006).

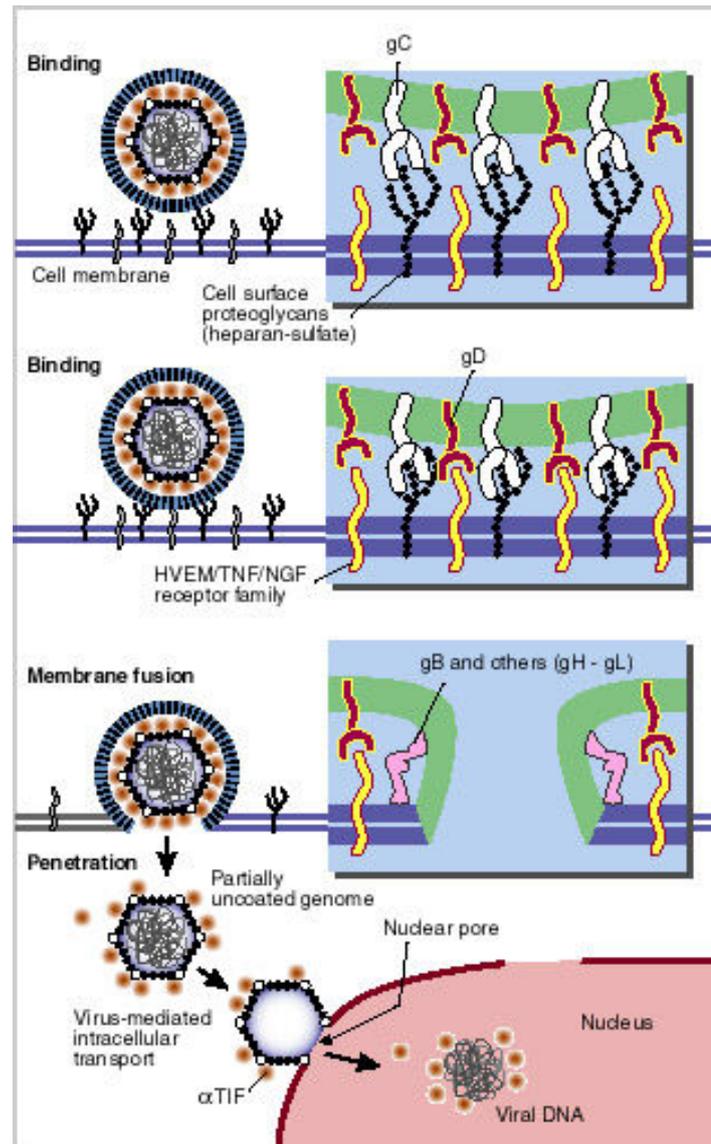


Figura 3: Etapa inicial da replicação viral. Adsorção e fusão do envelope viral com a membrana celular. Transporte do nucleocapsídeo até os poros nucleares da membrana nuclear e liberação do genoma no núcleo da célula hospedeira. Adaptado de WAGNER 2010.

Os genes virais, de acordo com a função de seus produtos e sua cinética de expressão são classificados em três grupos distintos: genes alfa (*immediate early* ou de transcrição imediata), beta (*early* ou iniciais) e gama (*late* ou tardios). Os alfa e beta têm sua expressão previamente à replicação do genoma viral e em grande quantidade, por outro lado o gene gama só é expresso após replicação do DNA (FRANCO & ROEHE, 2007).

Os genes alfa são transcritos logo após a liberação do genoma no núcleo e requerem uma proteína do tegumento viral, a *virion protein 16* (VP16) ou *trans-inducing factor* (α -TIF), para iniciar a transcrição dos genes (MISRA *et al.*, 1995; HINKLEY *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2004). Essas proteínas se associam a um fator

celular e induzem a transcrição de quatro genes que irão codificar cinco proteínas denominadas: *Bovine Infected Cell Protein* (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27 e BICP47). Essas proteínas irão ativar a expressão dos genes beta, e esses irão originar proteínas e enzimas envolvidas principalmente no metabolismo de nucleotídeos e na replicação do DNA viral (WIRTH *et al.*, 1992; GEISER *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2006; SAYDAM *et al.*, 2006). A expressão dos genes gama ocorre após a replicação do DNA viral. Os produtos desse gene, gama-1 e gama-2, são proteínas estruturais do núcleo, do capsídeo e do envelope, que são, então, utilizados para a síntese da nova progênie viral (ROIZMAN & KNIPE, 2001).

Após a penetração no núcleo o DNA genômico é circularizado e inicia-se o processo de separação das cadeias de fita dupla. Proteínas formam o complexo de iniciação que irá replicar o genoma em forma bidirecional (estrutura semelhante à letra theta, ou “ θ ”). Por mecanismos ainda desconhecidos a replicação muda para o modo de círculo rolante. A replicação por este mecanismo produz múltiplos do genoma que são, posteriormente, clivados em unidades subgenômicas (FRANCO & ROEHE, 2007).

O processo de montagem das partículas víricas é denominado morfogênese (METTENLEITER *et al.*, 2006). A montagem dos nucleocapsídeos inicia-se no citoplasma após a síntese das proteínas gama. Essas proteínas (UL18; UL19; UL35 e UL38) são transportadas até o núcleo onde a montagem dos capsídeos é finalizada. Os capsídeos são preenchidos com as moléculas do DNA viral através do auxílio de várias proteínas virais (UL33; UL32; UL28; UL25; UL15; UL 26.5) (MUYLKENS, *et al.*, 2007).

Durante a infecção pelos herpesvírus, a transcrição viral, a replicação do DNA, a formação dos capsídeos, o empacotamento do genoma viral ocorrem no núcleo e posteriormente os capsídeos intranucleares tem que ser envelopados e deixar o núcleo para ir ao citosol (METTENLEITER *et al.*, 2002) (Figura 4A). O processo de envelopamento do BoHV é um processo complexo. Recentemente, Mettenleiter e colaboradores (2009) apresentaram provas convincentes de que a formação da membrana viral ocorre por um duplo processo de envelopamento. Na etapa inicial de egresso nuclear, por brotamento, os capsídeos adquirem um envelope primário a partir da membrana nuclear interna (MNI) (METTENLEITER *et al.*, 2002) (Figura 4A e B). Para os nucleocapsídeos alcançarem a MNI duas proteínas são recrutadas, a UL31 e a UL 34 (MURANYI *et al.*, 2002; PARK & BAINES, 2006), promovendo a fosforilação

da MNI permitindo o contato dos nucleocapsídeos com a MNI (METTENLEITER *et al.*, 2009).

No próximo passo, o brotamento destes capsídeos através da fusão a membrana nuclear externa (MNE), levará a perda deste envelope primário (METTENLEITER, *et al.*, 2009) e, presumivelmente, do tegumento primário levando os capsídeos ao citoplasma (Figura 4C e D) (METTENLEITER, *et al.*, 2002).

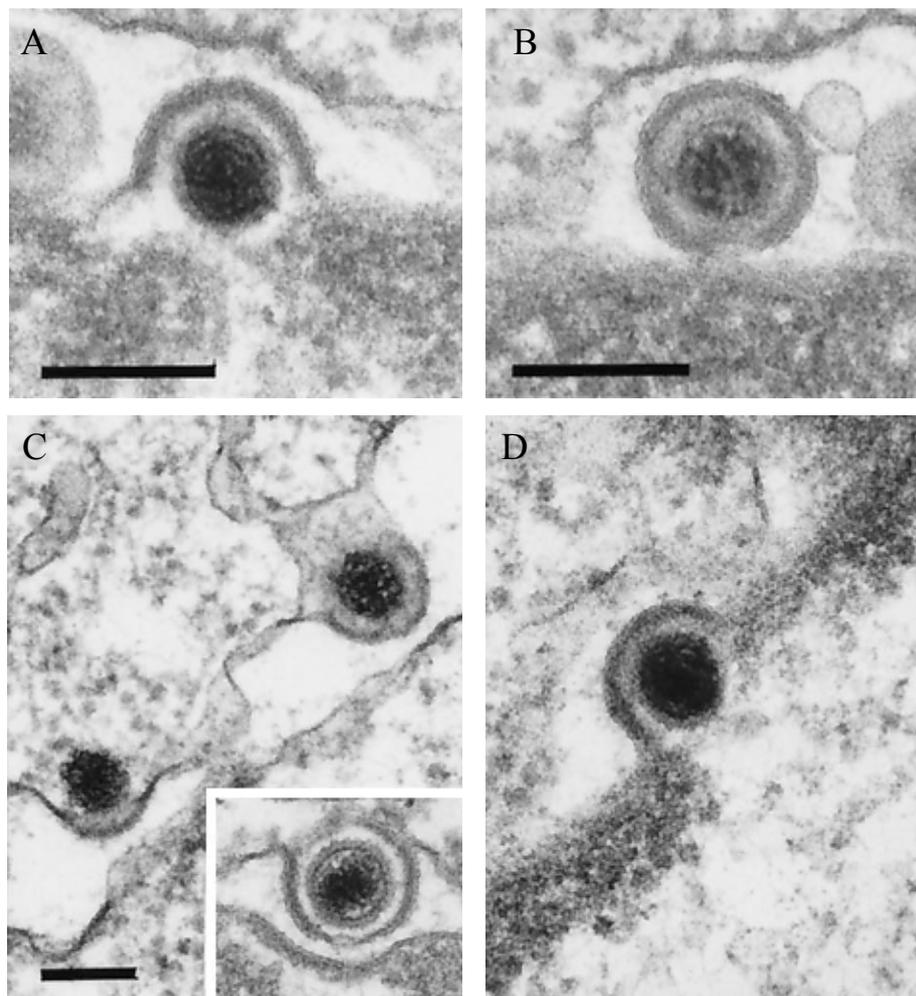


Figura 4: Microscopia eletrônica da montagem e egresso do herpes simplex humano. Foto A, capsídeo no espaço intranuclear. B, brotamento do capsídeo na membrana intranuclear. C, virion com o envelope primário adquirido pela membrana perinuclear, localizado no espaço perinuclear. D, fusão do virion com o envelope primário à membrana nuclear externa. (Modificado de METTENLEITER *et al.*, 2002).

O capsídeo contendo o DNA viral migra pela membrana nuclear para chegar ao citoplasma. As glicoproteínas do envelope viral são traduzidas no retículo endoplasmático rugoso e carregadas ao Complexo de Golgi em vesículas para dar continuidade ao processo de glicosilação. O envelopamento dos nucleocapsídeos formados no núcleo ocorre por brotamento em vesículas derivadas do Complexo de

Golgi. No citoplasma, os vírions acumulam-se dentro de vesículas para serem secretados para o meio extracelular; pode ainda ocorrer à disseminação das partículas virais através de contato célula-a-célula (METTENLEITER, 2002; METTENLEITER *et al.*, 2006). A figura 5 resume os passos de montagem do vírion até seu brotamento na membrana celular.

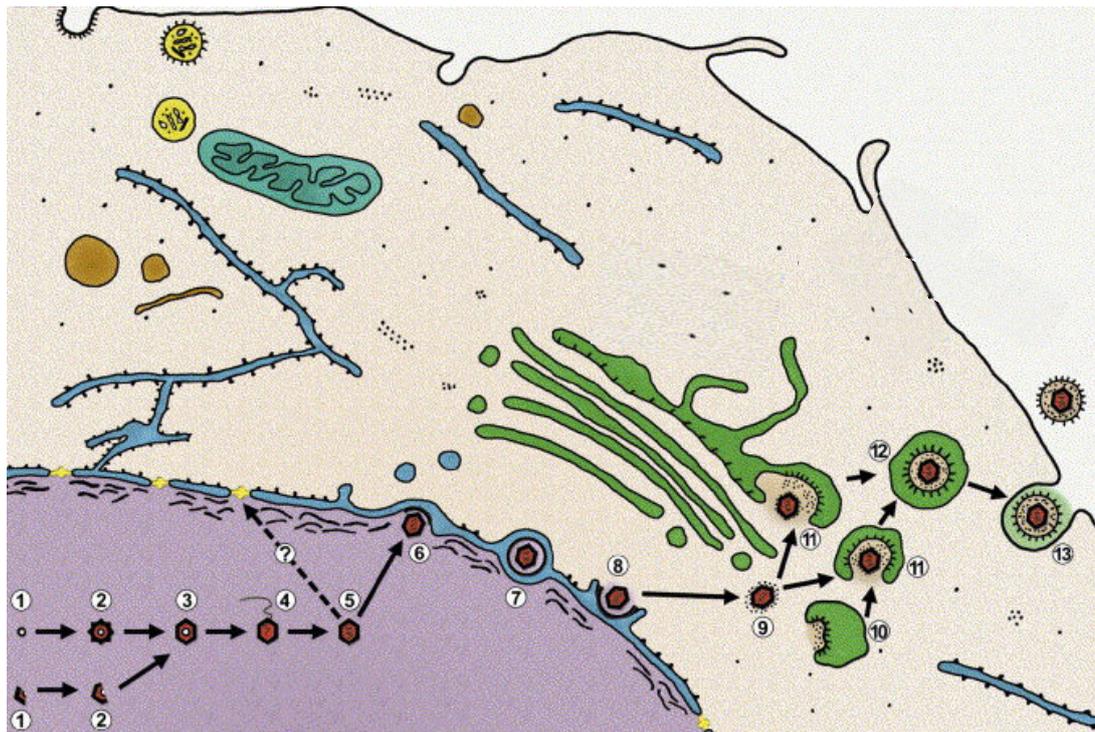


Figura 5: Esquema de montagem dos herpesvírus. Nos passos 1 a 3, está representada a montagem da partícula viral dentro do núcleo. Depois, o DNA é introduzido no capsídeo pré-formado (4) e esse conjunto é direcionado para a MNI (5 e 6). A partícula brota na MNI, resultando na formação de um envelope primário no espaço perinuclear (7). Esse envelope primário é perdido quando ocorre a fusão da partícula com a MNE (8). O núcleocapsídeo é direcionado ao citosol, onde vão ser incorporadas as proteínas do tegumento (9), enquanto que as glicoproteínas, que são incorporadas no local de envelopamento final, agregam-se em uma vesícula (10). Essas estruturas combinam-se durante o envelopamento secundário (11), então o vírion envelopado é transportado dentro de vesículas (12) à membrana plasmática para exocitose por brotamento (13) (Modificado de METTENLEITER *et al.*, 2006).

2.1.3 Latência

A infecção latente é um mecanismo de perpetuação dos vírus da família *Herpesviridae* nos seus hospedeiros. O principal sítio de latência dos alfa herpesvírus são os gânglios sensoriais, mas sítios não neuronais como tonsilas, células sanguíneas, linfonodos e baço tem sido sugeridos como locais relacionados ao estabelecimento e

reativação de infecções latentes por BoHV-1 (WINKLER *et al.*, 2000; FUCHS *et al.*, 1999; MWEENE *et al.*, 1996).

A infecção latente usualmente se estabelece nos neurônios dos gânglios sensoriais e autossômicos que inervam o sítio de replicação primária na mucosa infectada (FRANCO & ROEHE, 2007). O vírus é transportado através dos microtúbulos dos axônios até o corpo do neurônio (fluxo axonal retrógrado) para o núcleo dos gânglios neuronais associados (gânglios trigêmeos ou para-vertebrais), onde estabelece a infecção latente (ENQUIST *et al.*, 2002). Nesta fase o DNA viral permanece associado com histonas do hospedeiro na forma epissomal, circularizado (METTENLEITER *et al.*, 2006).

Durante a infecção latente a expressão de genes virais é extinta, exceto pelo gene que codifica transcritos relacionados à latência (LTR – “*latency-related transcript*”) (Henderson *et al.*, 2004). Tikoo *et al.* (1995) sugere que o mecanismo de latência se deve a dois conjuntos de fatores: o primeiro sugere que o mRNA do LAT (transcritos associados a latência) controla a expressão dos genes IE. Entretanto o mesmo mRNA codifica uma proteína regulatória de transcrição. Sugerem ainda a hipótese de mecanismos específicos das células nervosas que possam interferir de maneira negativa nos fatores de transcrição e na inibição da transcrição do DNA viral (TIKOO *et al.*, 1995).

Animais latentemente infectados servem de reservatório natural para o vírus durante toda a vida (DEVIREDDY & JONES, 1998). A reativação viral na infecção latente pode ocorrer após a exposição a estímulos naturais (estresse, transporte, parto, desmame) ou por tratamento com corticosteróides (JONES *et al.*, 2006). Estes fatores levam à reativação do vírus, o que se inicia com a transcrição do DNA viral e síntese de proteínas virais. Partículas virais recém formadas são transportadas de modo anterógrado até alcançarem a extremidade axonal (SMITH *et al.*, 2001). Os axônios estão ligados a células da mucosa que promovem a forma produtiva da infecção, com ou sem observação de sinais clínicos (ENQUIST *et al.*, 2002).

2.1.4 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 é o agente etiológico de diversas manifestações clínicas em rebanhos leiteiros ou de corte (ALEGRE *et al.*, 2001). Os isolados de BoHV-1 podem ser subdividido em três subtipos: BoHV-1.1 (1), BoHV-1.2 (2a) e BoHV-1.2b (2b). Esta

divisão de genótipos foi baseada em características genômicas e antigênica (JONES & CHOWDHURY, 2008). O subtipo 1 representa as amostras clássicas de vírus geralmente associadas com a doença respiratória, a IBR (CAMPOS *et al.*, 2009) e é frequentemente encontrado no trato respiratório e em fetos abortados. O subtipo 2a tem sido frequentemente associado com uma variedade de manifestações clínicas, incluindo trato genital (IPV/IPB), abortos e também IBR. O subtipo 2a é bastante prevalente no Brasil e esteve presente na Europa até a década de 70 (van OIRSCHOT *et al.*, 1995). Já o subtipo 2b está associado com doença respiratória leve e IPV/IPB, mas não tem sido associado a abortos (D'ARCE *et al.*, 2002). Outros sintomas como conjuntivite, ceratoconjuntivite e várias formas de problemas reprodutivos, como mortalidade embrionária e fetal, abortamento, natimortalidade e nascimento de bezerros fracos também estão associados ao BoHV-1 (ALEGRE *et al.*, 2001; TAKIUCHI *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2005).

Entretanto, casos de encefalite associadas ao BoHV-1 tem sido também relatados (ROELS *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2007), embora estes sejam menos frequentemente detectados, um estudo com 70 amostras de encéfalos bovinos identificou presença de agentes virais em 12 encéfalos, sendo 10 para vírus rábico, e dois para BoHV-1 (BATISTA *et al.*, 2010). Os dois BoHV-1 isolados por Batista *et al.* (2010) nesse estudo foram classificados no subtipo 2b (BoHV-1.2b → PG 1779/03) e no subtipo 1 (BoHV-1.1 → PG 2560/03) sendo esta última isolada de encéfalo positivo para o vírus rábico. Assim, o isolamento de BoHVs envolvidos em quadros de encefalite não é suficiente para permitir uma presuntiva classificação do agente envolvido, em BoHV-1 ou BoHV-5, sendo necessário testes complementares para diferenciação genômica entre eles (BATISTA *et al.*, 2010).

2.1.5 Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)

O BoHV-5 se caracteriza por induzir infecções inaparentes ou subclínicas ou doença de gravidade moderada em bovinos adultos podendo levar a óbito (ASHBAUGH *et al.*, 1997; CASCIO *et al.*, 1999; DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2006) e uma encefalite fatal em animais até seis meses de idade (BARTHA *et al.*, 1969; CARRILLO *et al.*, 1983a; MEYER *et al.*, 2001). Casos de enfermidades associadas ao BoHV-5 têm sido relatados nos EUA (REED *et al.*, 1973; D'OFFAY *et al.*, 1993), Austrália (FRENCH, 1962; JOHNSTON *et al.*, 1962), Brasil (RIET-CORREA *et al.*,

1989, 2006; SALVADOR *et al.*, 1998), Argentina (CARRILLO *et al.*, 1983b; PEREZ *et al.*, 2003) e raramente na Europa (MORETTI *et al.*, 1964; BARTHA *et al.*, 1969).

Estudos comparativos deste agente com as diferentes cepas de BoHV-1 baseados em mapeamento do DNA (BRAKE & STUDDERT, 1985), testes de neutralização cruzada (BAGUST & CLARK, 1972; METZLER *et al.*, 1986) e reatividade de anticorpos monoclonais (METZLER *et al.*, 1986) indicavam que essas cepas de vírus diferiam em propriedades genômicas e antigênicas. Assim, o herpesvírus da encefalite bovina (BEHV) (STUDDERT, 1989), previamente denominado BoHV-1 subtipo 3 (METZLER *et al.*, 1986), foi reconhecido como um tipo distinto pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 1992 (ROIZMAN *et al.*, 1992) e reclassificado como BoHV-5.

Devido ao fato do BoHV-1 e BoHV-5 estarem relacionados a várias enfermidades, como respiratórias, reprodutivas e nervosas, houve uma necessidade de melhor caracterizar os isolados virais. D'Offay *et al.* (1993), analisando o genoma de diferentes amostras de BoHV-5, propôs uma subdivisão em subtipos “a” e “b”, com base nos perfis de restrição enzimática obtidos. Mais recentemente, D'Arce *et al.* (2002), propôs a existência de um terceiro subtipo de BoHV-5, denominado “não a, não b”. Entretanto, até o momento, nenhuma relação clínica foi atribuída a estes subtipos.

2.1.6 Transmissão e epidemiologia

Os BoHV-1 e 5 podem ser transmitidos por aerossóis ou contato direto ou indireto entre animais. As secreções respiratórias e genitais são responsáveis pela disseminação do agente muitos dias após a infecção aguda, com ou sem evidência de sinais clínicos (MARS *et al.*, 2000a; PEREZ *et al.*, 2002).

A infecção também pode ser transmitida através de secreções oculares. Contato direto “focinho-focinho” é a rota preferencial do BoHV (MUYLKENS *et al.*, 2007), porém, a transmissão por aerossóis foi demonstrada em curtas distâncias (MARS *et al.*, 2000b). Infecções pela rota genital requerem contato direto pela monta natural ou indireta por inseminação artificial, através de sêmen contaminado (KUPFERSCHMIED *et al.*, 1986). O vírus pode ser encontrado em secreções nasais até 12 a 18 dias após infecção, porém a excreção do BoHV durante a reativação não ocorre na mesma quantidade e intensidade que ocorre na forma aguda da infecção, havendo menor produção de partículas víricas. Animais que reativam a infecção constituem-se em fonte

de infecção para o rebanho (BRATANICH *et al.*, 1991; CASCIO *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002). Outras formas não menos importante de disseminação do BoHV são a inseminação artificial e transferência de embriões (van OIRSCHOT *et al.*, 1995; ESTEVES *et al.*, 2003). Vírus infeccioso já foi encontrado em leite de vacas, sendo esta mais uma possível fonte de infecção para terneiros (CAMPOS, 2009).

O Herpesvírus bovino tipo 1 é um patógeno amplamente disseminado no mundo (KAHRS, 2001). Causa grandes perdas econômicas na pecuária mundial e sua prevalência em rebanhos bovinos brasileiros atinge diferentes coeficientes de soropositividade que variam de 11% a 96% (BARBOSA, *et al.*, 2005). O vírus causador da IBR, o BoHV-1, foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1956 e no Brasil em 1978 (FRANCO & ROEHE, 2007). Apresenta significativas diferenças de incidência e prevalência em relação à região geográfica e tipo de exploração pecuária (corte, leite, intensiva e extensiva) sendo essa incidência mais elevada em bovinos de engorda do que em rebanhos leiteiros devido à freqüente introdução de animais susceptíveis (ACKERMANN & ENGELS, 2006).

Na Europa, países como Dinamarca, Suíça, Finlândia e Áustria conseguiram eliminar o vírus através da identificação e remoção de animais infectados (ACKERMANN & ENGELS, 2006). Outros países europeus apresentam percentuais elevados variando entre 35 a 55 % de soropositividade (STILWELL *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos e Canadá a infecção é endêmica, apresentando índices de prevalência elevados (CÁRDENAS *et al.*, 2006). Na Austrália, estudos de sorologia revelaram a presença do agente, sendo o BoHV-1.2b o predominante neste país (*Animal Health Australia*, 2008). Não muito distante, na Nova Zelândia o subtipo 1.2b também é o subtipo circulante entre os bovinos (WANG *et al.*, 2006).

Na América do Sul, países como Argentina, Uruguai e Colômbia, o BoHV-1 encontra-se presente em forma endêmica, com prevalências de animais soro-reagentes variando de 8,8% a 84,1% (GUARINO *et al.*, 2008). Essa variação nas taxas de prevalência para as diferentes regiões podem provavelmente ser explicadas, em parte, pelo tipo de criação e manejo dos animais, que variam bastante em cada região (HOLZ *et al.*, 2009). Fatores como clima e relevo, o tipo de população, e o tipo de exploração da propriedade (LOVATO *et al.*, 1995) podem influenciar as taxas observadas. Além desses citados, foi demonstrado que as diferenças em prevalência podem também estar relacionadas com as cepas de vírus utilizadas para os testes laboratoriais, o que pode

levar a alterações na sensibilidade da soroneutralização (SN). No Brasil, inquéritos sorológicos geralmente utilizam uma única cepa de referência para os testes. Entretanto, para se obter uma maior sensibilidade, os testes de SN devem ser executados frente a várias amostras de vírus (HOLZ *et al.*, 2009).

Curiosamente, a infecção pelo BoHV-5 parece ser causa de morbidade e mortalidade importante somente em países do Hemisfério Sul (FRANCO & ROEHE, 2007). Entretanto, surtos de meningoencefalite herpética foram relatados em vários países como Austrália (JOHNSTON *et al.*, 1962), Estados Unidos (BARENFUS *et al.*, 1963), Hungria (BARTHA *et al.*, 1969), Canadá (BECK, 1975), Argentina (CARRILLO *et al.*, 1983) e Uruguai (DIAS *et al.*, 1982). No Brasil já foram descritos casos clínicos ocorridos nos Estados do Rio Grande do Sul (ELIAS *et al.*, 2004), Mato Grosso (COLODEL *et al.*, 2002), Mato Grosso do Sul (SALVADOR *et al.*, 1998), Goiás (PAULA *et al.*, 2005), São Paulo (SALVADOR *et al.*, 1998), Paraná (HALFEN & RIET-CORREA, 2007), Rio de Janeiro, Minas Gerais (SILVA *et al.*, 2007a; GOMES *et al.*, 2002) e Pará (RIET-CORRÊA *et al.*, 2006).

Atualmente não é possível precisar a real prevalência e distribuição pelo BoHV-5 pois não existem testes sorológicos eficazes para diferenciar infecções entre o BoHV-1 ou BoHV-5 (ROEHE *et al.*, 1997).

2.1.7 Patogenia

A porta natural de entrada do BoHV é a mucosa do trato respiratório superior ou do trato genital. Ao penetrar nas células epiteliais da mucosa oro-nasal, o BoHV inicia o ciclo lítico de sua replicação, gerando nova progênie viral e levando a célula à morte ocasionando os sinais clínicos da infecção que consistem em congestão nasal, secreção e lesões vesiculares a erosivas (MUYLKENS *et al.*, 2007). O período de incubação oscila entre 2 a 7 dias, dependendo da via e forma de contato (KAHRS, 1977).

A replicação nas células-alvo da infecção resulta em uma alta produção de vírus que é excretada nas secreções (MUYLKENS *et al.*, 2007), sendo este o fator responsável pela disseminação da infecção para outros animais (ENGELS & ACKERMANN, 1996). A disseminação viral nos tecidos pode ocorrer por dois diferentes caminhos: os novos vírions podem ser liberados para o meio extracelular e infectando novas células ou disseminando-se célula-a-célula entre células contíguas (BARANOWSKI *et al.*, 1996; REBORDOSA, *et al.*, 1996).

Em seguida à replicação primária, o vírus invade as terminações nervosas do nervo olfatório e trigêmeo e é transportado através de fluxo axonal retrógrado até os corpos neuronais situados nos gânglios sensoriais e autonômicos (GERDTS *et al.*, 2000).

No estudo da patogenia de BoHV-1 e BoHV-5 é importante distinguir entre neuroinvasividade e neurovirulência. A neuroinvasividade é definida como a capacidade do vírus invadir, multiplicar-se e distribuir-se no SNC, ao passo que neurovirulência refere-se à capacidade do agente de provocar lesões nesse sistema (SPILKI *et al.*, 2002). Assim, embora BoHV-1 e o BoHV-5 sejam genética e antigenicamente relacionados, diferem em relação a sua neuroinvasividade e neurovirulência. Em relação a neuroinvasividade, o BoHV-1 costuma alcançar o SNC, preferencialmente através da infecção das terminações nervosas do gânglio trigeminal, onde a infecção latente é estabelecida, ao passo que o BoHV-5 é capaz de infectar diferentes regiões do cérebro através das duas vias de inervação, a trigeminal e a olfatória (MUYLKENS *et al.*, 2007). Spilki *et al.* (2002) relatam que o BoHV-5 foi capaz de invadir, replicar e distribuir-se em várias regiões do SNC em coelhos. O agente foi isolado do bulbo olfatório, córtex anterior, córtex posterior, diencefalo e mesencefalo sendo que no córtex cerebral anterior e posterior, os títulos de vírus foram maiores quando inoculados pela via intra-nasal (SPILKI *et al.*, 2002). Isto se deve ao fato da replicação primária do vírus na mucosa respiratória (MEYER *et al.*, 1996). Spilki *et al.* (2002) isolaram o agente do SNC após inoculação pelas vias intratecal (IT) e intranasal (IN) demonstrando a capacidade de neurovirulência do BoHV-5 neste tecido.

Em situações onde o BoHV-1 está associado a encefalites em bovinos, acredita-se que o vírus seja capaz de invadir e replicar-se em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, como ocorre na encefalite por BoHV-5 (STORTS, 1998). Por outro lado amostras de BoHV-1 inoculadas não foram isoladas, mostrando-se ineficientes na capacidade de replicação no SNC de coelhos, sugerindo um neurotropismo e neurovirulência pouco exacerbados nessa espécie (SPILKI *et al.*, 2002).

2.1.8 Encefalite e meningoencefalite

Mais de cem vírus distintos são capazes de causar encefalite aguda (W.H.O., 2011). Além de encefalite, uma vez dentro do SNC, os vírus podem ser responsáveis pela ocorrência de vários padrões de doença neurológica, incluindo radiculite, mielite

ou uma combinação destas, como a meningoencefalite, que é a inflamação do encéfalo e das meninges. Na prática, a grande maioria das infecções de SNC se manifesta como meningoencefalite. Os sinais podem incluir febre alta, dor de cabeça, sensibilidade a luz, rigidez na nuca e nas costas, vômitos, confusão e, em casos graves, convulsões, paralisia e coma (W.H.O., 2011). O vírus rábico e o herpesvírus bovino tipo 5 estão entre os vírus que mais causam encefalite e meningoencefalite em bovinos (SANCHES *et al.*, 2000).

A encefalite herpética causada pelo BoHV-5 é uma doença aguda geralmente fatal que apresenta baixa morbidade e alta mortalidade (até 100%). A faixa etária acometida é ampla e a doença ocorre na forma de surtos ou casos esporádicos. No Rio Grande do Sul, surtos ocorrem em animais jovens, entre 1 e 18 meses de idade (RISSI *et al.*, 2006) embora em alguns casos sejam descritas ocorrências até 2 anos e meio de idade (RIET-CORREA *et al.*, 1996). No Brasil, a maioria dos casos ocorre em animais jovens de 13-18 meses (BARROS *et al.*, 2006).

Após a infecção do epitélio nasal pelo BoHV-5 ocorre a invasão das terminações nervosas dos neurônios que se localizam naquele epitélio (MEYER *et al.*, 2001). A invasão e disseminação pelo BoHV-5 a partir da cavidade nasal ocorre predominantemente pela via olfatória e, secundariamente, pela via trigeminal (FLORES *et al.*, 2009).

O período de incubação é em geral de 1 a 15 dias, sendo mais comum entre 4 e 7 dias (DIEL *et al.*, 2005). A doença clinicamente aparente é caracterizada por tremores musculares, opistótono, cegueira, nistagmo, convulsões, bruxismo, sialorréia, incoordenação motora, andar em círculo e morte (BELKNAP *et al.*, 1994; MEYER *et al.*, 2001; VOGEL *et al.*; 2003; HÜBNER *et al.*, 2005; SILVA *et al.*; 2006). Na primeira semana após a inoculação intra-nasal, os animais apresentam sinais de rinite, conjuntivite ou mesmo se mantêm assintomáticos, nessa etapa os animais podem se recuperar da infecção, progredir para doença neurológica ou morrer (DELHON *et al.*, 2003).

À necropsia normalmente não existem alterações significativas, variam de acordo com a intensidade de lesões degenerativas e inflamatórias do encéfalo (SALVADOR *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 2001; COLODEL *et al.*, 2002; RISSI *et al.*, 2006). As principais alterações macroscópicas incluem malácia cortical, comumente localizada no córtex frontal (RISSI *et al.*, 2006).

A principal alteração histológica encontrada no SNC é uma meningoencefalite difusa, não-supurativa com áreas de malácia, caracterizada por gliose focal e/ou difusa, infiltrado inflamatório perivascular composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (SALVADOR *et al.*, 1998; ELIAS *et al.*, 2004). Outra característica importante é a presença de corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranucleares em neurônios (SALVADOR *et al.*, 1998).

2.2 VÍRUS DA RAIVA

O vírus da raiva (VR) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (ICTV). Este gênero inclui alguns outros vírus denominados “vírus relacionados à raiva”, os quais apresentam semelhanças antigênicas com o VR e têm sido isolados de morcegos (BATISTA *et al.*, 2007). O gênero *Lyssavirus* é subdividido em sete genótipos. O VR é classificado como genótipo “1”, sendo o protótipo do gênero (TORDO & POCH, 1988).

A partícula do vírus rábico apresenta um formato característico similar a um projétil de revólver, com um diâmetro de aproximadamente 75 nm e comprimento entre 100 e 300 nm (DAVIES *et al.*, 1963). O vírion apresenta o genoma disposto em formato de mola e envolto em uma proteína denominada nucleoproteína (N); este conjunto forma um nucleocapsídeo helicoidal, com o RNA e a proteína N unidos (BANERJEE, 1987; ISENI, 1998). O nucleocapsídeo e algumas moléculas de outras três proteínas estruturais (P, M e L) são circundados por um envelope, o qual é derivado das membranas celulares. Neste envelope estão inseridas moléculas da glicoproteína “G”, cujas moléculas o atravessam e são projetadas para a parte externa do vírion (BANERJEE, 1987). O genoma viral é composto por RNA de fita simples, com tamanho aproximado de 12 Kb (WUNNER, 1991; SMITH, 1996). O genoma codifica cinco proteínas: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P previamente denominada M1), a proteína da matriz (M, previamente denominada M2), a glicoproteína (G) e a RNA polimerase RNA viral-dependente (L).

A adsorção do vírus à célula hospedeira é mediada pela proteína G com os receptores celulares e levam à fusão e internalização dos vírions (COX *et al.*, 1977; COLL, 1995; TORDO, 1996). Após a adsorção à célula hospedeira, o vírion penetra na célula por fagocitose, sendo englobado por vesículas ricas em clatrina, os lisossomos fundem-se à vesícula, liberando a ribonucleoproteína (RNP) no citoplasma celular e

inicia-se o processo de replicação (TORDO, 1996; THOULOZE *et al.*, 1998). O genoma de polaridade negativa deve ser inicialmente transcrito em um genoma de polaridade positiva (anti-genoma) para dar início à produção de proteínas. Estas cópias positivas servirão de molde para a síntese de novos genomas - de polaridade negativa - que irão fazer parte dos novos vírions a serem formados.

Na montagem dos novos vírions, o complexo formado pelas proteínas N, P e L realiza a encapsidação do genoma. A proteína M envolve a RNP; esse complexo vai para a membrana plasmática e a M inicia o “enovelamento” da partícula, conferindo-lhe o formato de “mola” que caracteriza a disposição helicoidal da RNP. Em seguida, as partículas ligam-se à membrana celular, que originará o envelope onde estão inseridas moléculas da glicoproteína G; tem início o brotamento, que irá liberar novos vírions. Esse processo não causa lise das células infectadas (SUGAMATA *et al.*, 1992; WARRELL & WARRELL, 2004).

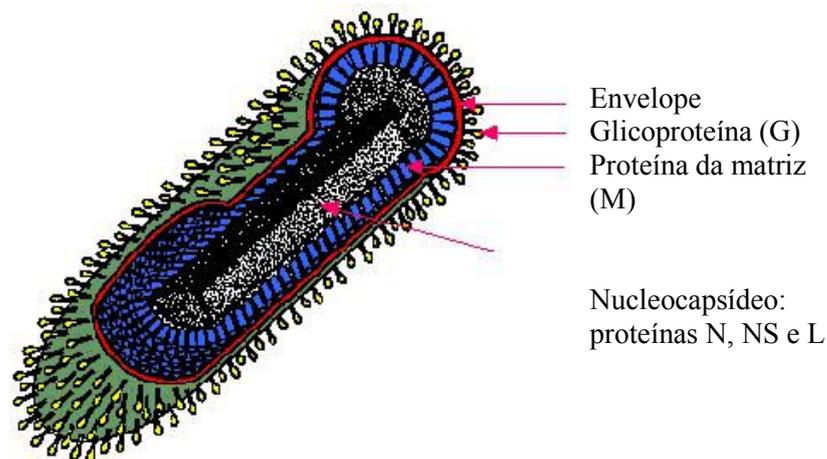


Figura 6. Esquema representativo do vírus rábico: as projeções da glicoproteína G aparecem estendendo-se do envelope lipídico que envolve o nucleocapsídeo. A proteína da matriz M2 acompanha o envelope viral e interage com a glicoproteína.

Fonte: <http://fiona.umsmed.edu/~yar/zoo.html>

2.2.1 Epidemiologia

A raiva está disseminada em todos os continentes, exceto na Austrália e Antártica. Países como Inglaterra, Irlanda, Japão e países escandinavos obtiveram sucesso na erradicação da doença. A alta capacidade de adaptação do vírus, o qual pode

adotar como reservatórios diferentes espécies, permite esta ampla distribuição (BATISTA *et al.*, 2007).

O vírus da raiva é mantido na natureza por ciclos inter-relacionados, denominados ciclos urbanos e silvestres, aéreos e rurais. O Ciclo “urbano” refere-se à raiva em cães e gatos domésticos, o ciclo aéreo refere-se à raiva em morcegos (BATISTA *et al.*, 2007); o ciclo “rural”, à raiva dos herbívoros, que envolve, principalmente bovinos. No ciclo urbano o cão doméstico se constitui no principal hospedeiro (HIPÓLITO, 1948). O potencial zoonótico da raiva é mais proeminente neste ciclo devido à interação entre cães e humanos (BATISTA *et al.*, 2007). Cães podem ser infectados por amostras de VR que tem outras espécies como hospedeiros naturais. Nesses casos, esses incidentes freqüentemente envolvem morcegos (CARINI, 1911; CARRIERI *et al.*, 2001; CARNIELI *et al.*, 2006) acarretando uma das principais preocupações de controle desta zoonose: a possibilidade da re-introdução da raiva urbana em populações caninas a partir de vírus associado a outros ciclos da infecção (BATISTA *et al.*, 2007).

No ciclo aéreo a presença de morcegos contaminados com o vírus representa um sério problema, especialmente para animais domésticos e seres humanos, constituindo-se em uma fonte de contaminação crítica (KOTAIT, 1996). Os morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*, são os principais reservatórios do vírus na natureza no ciclo aéreo se constituindo os principais transmissores para os bovinos (BATISTA *et al.*, 2007).

No ciclo silvestre o vírus tem como reservatórios naturais diferentes espécies. A raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) na Europa, é o reservatório natural do vírus em seu ciclo silvestre; na América do Norte, além das raposas, gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon sp.*) são também hospedeiros naturais do vírus. No Brasil a raposa cinzenta (*Dusicyon vetulus*) foi igualmente demonstrada ser hospedeira natural de uma variante do vírus (BORDIGNON *et al.*, 2001).

A situação da raiva no Brasil apresenta níveis diferenciados de distribuição nas regiões do País. Na região Sul, a raiva urbana está controlada, os últimos casos em humanos no Rio Grande do Sul e Santa Catarina ocorreram em 1981 (BORDIGNON *et al.*, 2005). No Paraná, o último caso foi registrado em 1987 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Mas, em 2001 ocorreu no Rio Grande do Sul um caso em felino na qual a variante do VR era de origem de morcegos não hematófagos (SCHAEFER *et al.*, 2002). Em 2007 um cão foi infectado com uma variante de quiróptero usualmente detectada em morcegos insetívoros (BATISTA *et al.*, 2007). Assim, apesar de episódios

isolados de contaminação com vírus de outros hospedeiros naturais, as variantes do VR que tem como hospedeiro natural o cão não tem mais sido detectadas em populações caninas na região Sul. Nas demais regiões do país ainda apresentam casos de raiva urbana (BATISTA *et al.*, 2007).

Além dos problemas de saúde pública, a raiva proporciona grandes prejuízos à pecuária nacional, sendo responsável nos últimos dez anos por mais de 23000 casos notificados em bovinos (BATISTA *et al.*, 2007). Na região sudeste ocorreu um aumento nos casos de raiva notificados em herbívoros; entretanto, é possível que esses dados reflitam uma maior eficácia na notificação (BATISTA *et al.*, 2007). Na região Nordeste, os casos em ovinos e caprinos representam uma parcela significativa dos casos de raiva em herbívoros (GUEDES *et al.*, 2007).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.3.1 Diagnóstico de BoHV-1 e BoHV-5

Dentre os métodos mais utilizados para a detecção de infecções pelo BoHV-1 ou BoHV-5 estão o isolamento viral, testes sorológicos, imunohistoquímica, ou pelo chamado diagnóstico molecular, onde são pesquisados fragmentos de DNA genômicos (MOORE *et al.*, 2000).

2.3.1.1 Isolamento viral

O isolamento viral é a técnica padrão para a detecção do BoHV-1 ou BoHV-5, onde suspensões de tecidos ou secreções são preparadas e inoculadas em cultivos celulares visando o isolamento do agente (FERRARI *et al.*, 2007). Após um período variável de incubação, a presença do vírus é evidenciada pelo ECP característico do vírus (TAKIUCHI *et al.*, 2003). Tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 produzem efeito citopático (ECP) bastante evidente em vários tipos de células, incluindo cultivos primários e linhagens estabelecidas. Devido à maior praticidade, células de linhagem de rim de bovino (MDBK – *Madin-Darby bovine kidney*) são as mais utilizadas para o isolamento viral. O BoHV-1 e BoHV-5 geralmente causam ECP entre 24 e 72 horas após a inoculação e raramente são necessárias mais do que duas ou três passagens. Ao final da terceira passagem, caso não haja evidência de ECP, o material é considerado negativo para vírus (FRANCO & ROEHE, 2007).

2.3.1.2 Diagnóstico molecular

A dificuldade em se diferenciar as infecções por BoHV-1 das infecções por BoHV-5 é em virtude da grande semelhança antigênica e genômica entre os dois vírus. Essa grande semelhança é a causa dos altos índices de reação cruzada, que dificultam a diferenciação pelos testes de rotina (ROIZMAN *et al.*, 1992; CHOWDHURY, 1995). Procedimentos mais específicos, baseados em vários tipos de provas de DNA, apresentam grande vantagem nesse contexto, pois costumam ser muito sensíveis.

O uso de técnicas de detecção de DNA tem revolucionado o diagnóstico de infecções víricas, especificamente pelo desenvolvimento da PCR, descrita por Saiki *et al.* (1985), que iniciou um período, ainda em progresso, de rápida evolução nos laboratórios de diagnóstico virológico (STORCH, 2001).

O principal objetivo da PCR é a amplificação de uma região alvo no DNA. Possui como vantagens a alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução e aplicação em diferentes amostras clínicas. Além disto, pode ser utilizada em amostras que contém vírus inativado ou que mantém o vírus no estado latente (DEBIASI & TYLER, 2004). Quando a presença do DNA viral nos sítios de latência é o único indicativo da infecção (não sendo detectado por sorologia), a PCR é importante na detecção desta forma de infecção (FRANCO & ROEHE, 2007).

Outra linha de diagnóstico seria a combinação de diferentes abordagens moleculares (PCR-RFLP, Nested PCR, hibridizações *in situ*) que também fornecem métodos de diferenciar os vírus, o que é importante para a confirmação de tropismos e dados epidemiológicos das viroses (TURIN *et al.*, 1999). Por exemplo, o uso de enzimas de restrição após a amplificação de determinada região do genoma (PCR-RFLP) é um método que pode ser usado para se subtipar o BoHV-1 e o BoHV-5 (D'ARCE *et al.*, 2002). A nested PCR também permite a discriminação entre as infecções por BoHV-1 e BoHV-5 pois os produtos amplificados pela primeira PCR servem como molde a outros primers complementares às seqüências localizadas internamente no produto da primeira reação. Em relação à PCR tradicional, a nested PCR possui as vantagens de maior sensibilidade (duas etapas de amplificação) e especificidade (BRUM & WEIBLEN, 2007).

A detecção de genomas de BoHV-1 ou BoHV-5 em encéfalos bovinos, na manifestação de sinais neurológicos, sem o isolamento de vírus infeccioso não indica infecção aguda (VOGEL *et al.*, 2003). Portanto, a PCR e nested PCR para o diagnóstico

de encefalites por estes agentes deve ser feito com cautela, pois animais latentemente infectados e apresentando sintomas neurológicos devido a outras etiologias, como a raiva e, sendo positivos na PCR para BoHVs, ainda assim não é possível afirmar que este seja o agente causador da patologia devido a impossibilidade de isolar o vírus em forma infecciosa.

O diagnóstico de uma virose é importante para a determinação da prevalência da infecção e para o estabelecimento de alternativas de controle e erradicação da mesma. Assim, o presente estudo analisou a ocorrência de infecções por BoHV-1 e/ou BoHV-5 em amostras provenientes de encéfalos bovinos submetidas ao diagnóstico de raiva para avaliar seu possível envolvimento nos quadros de encefalite que originaram a suspeita inicial de raiva.

2.3.2 Diagnóstico de raiva

O tecido de eleição para o diagnóstico de raiva é o encéfalo dos animais suspeitos. Recomenda-se enviar ao laboratório fragmentos de tecidos encefálicos, devendo ser incluídas porções do cerebelo, córtex e circunvoluções do hipocampo (ou cornos de Amon) (BATISTA *et al.*, 2007). Animais pequenos (p.ex. morcegos, gambás, sagüis) devem ser remetidos inteiros ao laboratório.

2.3.2.1 Imunofluorescência direta

A IFD baseia-se na detecção do vírus em esfregaços de tecido com anticorpos específicos conjugados a uma proteína fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) (DEAN *et al.*, 1996). Esta técnica passou a ser amplamente utilizada devido à sua alta sensibilidade e especificidade. A IFD chega a atingir sensibilidade e especificidade próximas a 100%. Em função disso, essa técnica permanece como procedimento de eleição para o diagnóstico rápido de raiva. Usualmente, a IFD (Figura 7) é acompanhada de um teste de confirmação biológica, como a inoculação em camundongos lactentes (BATISTA *et al.*, 2007).

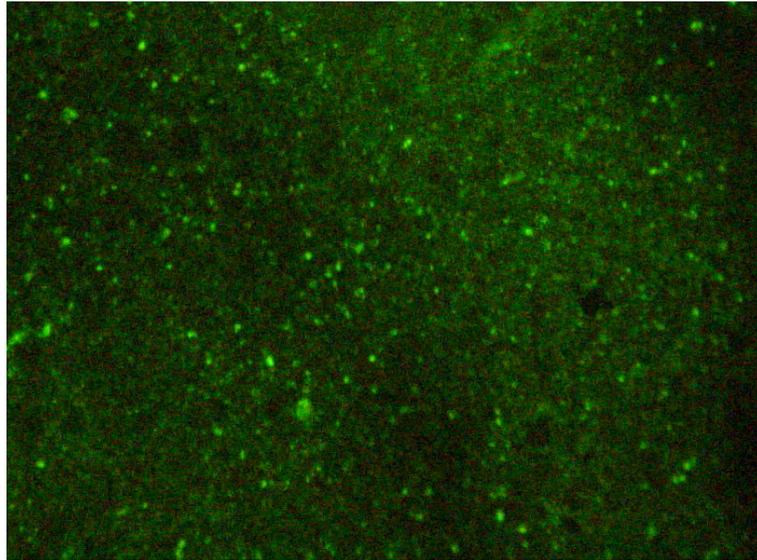


Figura 7: Imunofluorescência positiva para raiva em encéfalo bovino. Fonte: ROEHE, P.M. 2007. IPVDF.

A prova biológica é realizada em todas as amostras suspeitas de raiva, independente do resultado da IFD, é feita através de inoculação do encéfalo suspeito em camundongos lactentes (FLORES & TOBIAS, 2008).

2.4 OBJETIVOS

- Analisar a ocorrência de infecções por BoHV-1 e/ou BoHV-5 em amostras de tecido encefálico bovino submetidas ao diagnóstico de raiva e avaliar seu possível envolvimento nos quadros de encefalite que originaram a suspeita inicial de raiva.

CAPÍTULO 1

1. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigo científico.

Trabalho em preparação.

ISOLATION AND PCR DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUSES IN BRAIN TISSUES OF CATTLE SUBMITTED TO RABIES DIAGNOSIS

KUNERT FILHO, H.C.¹; CAMPOS, F.S.¹; LIMA, F.E.S.¹; BRITO, W.M.E.D.³; RIJSEWIJK, F.A.M.¹; FRANCO, A.C.¹; ROEHE, P.M.^{1,2}

1- Laboratório de Virologia, DM-ICBS / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Sarmiento Leite nº 500. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 900150-170.

2- Equipe de Virologia. FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Estrada Municipal do Conde nº 6000. Eldorado do Sul, RS, Brasil; CEP 92990-000.

3- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Departamento de Microbiologia. Laboratório de Virologia Animal. Universidade Federal de Goiás (UFG). Rua 235, s/n. Goiânia, GO, Brasil. CEP 74605-050.

ABSTRACT

Although rabies is still the major infectious cause of neurological disease in cattle in Brazil, bovine herpesviruses types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are highly prevalent throughout the country and are frequent causes of encephalitis. The aim of the present study was to investigate whether BoHV-1 and BoHV-5 would play any role in cases of encephalitis in cattle in samples submitted to the rabies reference diagnostic laboratory in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, in the period 2009-2010. Virus isolation attempts were carried out in 101 specimens (39 rabies-infected and 62 rabies-uninfected specimens). After three passages in MDBK cells, infectious herpesviruses were not isolated in any of the specimens. Of the 101 total samples analyzed, this test revealed that 25.7% (26/101) of cattle were infected with BoHV-1 and 21.8% (22/101) were infected with BoHV-5. Genomes of both types were detected in 29.7% (30/101) samples. With the 39 samples positive for rabies virus, BoHV-1 genome was detected in 23% (9/39) and 15.4% (6/39) were positive for BoHV-5 as well as in 41% (16/39) of these samples, which were positive for both BoHVs. On the other hand, the negative samples for rabies virus, 27.4% (17/62) also were positive for BoHV-1, as well and 25.8% (16/62) were positive for BoHV-5. Genomes of both BoHVs were detected in 22.6% (14/62) of the specimens. These differences are not statistically significant indicating no correlation between the occurrence of rabies and herpesvirus infections in the animals. These results do not imply that the herpesviruses detected, even showing a high incidence, were the causative agents of meningoencephalitis in the samples tested, once it was not possible to isolate virus in its infectious form, however it suggests a

latent infection in the animals involved with neurological signs of meningoencephalitis whose primary suspicion was rabies.

KEYWORDS: Encephalitis; bovine herpesvirus; BoHV-1; BoHV-5; rabies; PCR.

INTRODUCTION

Rabies virus and Bovine herpesvirus 1 and 5 (BoHV 1 and 5) are the most important viral agents associated with encephalitis in cattle, causing great economical losses to cattle production (Sanches *et al.*, 2000). BoHV-1 is one of the most important pathogens of cattle and is distributed worldwide (Kahrs, 2001). BoHV-1 generally infects cattle older than 6 months of age, once maternal immunity has waned (Bennett & Ljpelaar, 2003). Infection with BoHV-1 causes a variety of clinical diseases including infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV) and infectious pustular balanoposthitis (IPB). Eventually, BoHV-1 may also cause neurological disease in cattle (Roels *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007).

BoHV-5 is the causative agent of bovine herpetic encephalitis (Meyer *et al.*, 2001). The disease is characterized by tremors, nystagmus, teeth grinding, circling, ataxia, recumbency, paddling and death (Beltrão *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 1983a; Meyer *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002). The disease usually affects cattle up to two years old, but occasionally older animals may be involved (Salvador *et al.*, 1998). Bovine herpesvirus encephalitis or meningoencephalitis have been frequently detected in cattle in Brazil, Argentina and Uruguay, and only rarely in the Northern hemisphere (Carrillo *et al.*, 1983a; Weiblen *et al.*, 1989; Salvador *et al.*, 1998).

Although they share common biologic properties, these two herpesviruses differ in their neuroinvasiveness and neurovirulence. When infection takes place via oronasal route, BoHV-1 neuroinvasion may occur but it is believed not to go further than the neuron located in the trigeminal ganglion, where the latent infection is established (Muylkens *et al.*, 2007). Eventually, if the virus reaches the CNS, it may cause encephalitis (Roels *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007) On the other hand, BoHV-5 is able to invade the CNS through the trigeminal and/or the olfactory pathways and infect different regions of the brain, causing acute and latent infections (Carrillo *et al.*, 1983a; Perez *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2003). However, the actual reasons for the more exacerbated neurovirulence of BoHV-5 in relation to BoHV-1 remain unknown.

The neurological signs caused by viral infections of the CNS in cattle are similar to those induced by other diseases, such as leptospirosis (Lilenbaum et al., 2007), tuberculosis (Barros, et al., 2006), plant poisoning (Barros et al., 1992) mycotoxins (Loretti et al., 2003), babesiosis (Almeida et al., 2005; Rodrigues et al., 2005), congenital malformations (Sanches et al., 2000) poisoning by sodium chloride (NaCl) and botulism (Spilki et al., 2003). This may bring difficulties to the diagnosis of disease outbreaks, especially those with a public health impact like bovine rabies.

This study was conducted to search for BoHV-1 and BoHV-5 in cattle brains submitted to rabies diagnosis in the Rio Grande do Sul State in order to determine whether these viruses would have any role in the etiology of encephalitis which originated the suspicion of rabies.

MATERIALS AND METHODS

Brain tissue samples

Cattle brain (including cerebellum, thalamus, midbrain, pons, medulla oblongata, cervical medulla) specimens submitted to rabies diagnosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, in the period 2009-2010 were separated and stored individually in Petri dishes and frozen at -80°C until processed. During this period 101 cattle brain tissue samples were received from 51 different regions throughout of the State (see annex 1). From the examined samples, 39 were diagnosed positive for rabies. Rabies diagnosis is based on the direct immunofluorescence technique (DIF), with high sensitivity and specificity (Gonçalves et al., 2002). The DIFT is based on detecting virus in smears of tissue with specific antibodies conjugated to a fluorescent substance (FITC) (Dean et al., 1996).

Cells

Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, subcultured from ATCC CCL-22, were used to isolate BoHV-1 and BoHV-5 viruses. The cells were kept in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, Gibco) with 10% goat serum supplemented with antibiotics [100 µL/L enrofloxacin (Cultilab), 400 µL/L amphotericin B (Cristália)]. The preparation of samples for virus isolation was performed with EMEM with 2% goat serum supplemented with antibiotics as above.

BoHV isolation

For BoHV isolation, brain tissue samples were processed individually in a laminar flow to prevent cross contamination. The inocula were prepared with sterile surgical material. Fragments of brain were collected from different areas from cortex, cerebellum and spinal cord and were weighed up to 1g. The fragments were macerated with sterile sand and 10 mL of EMEM were added to reduce the cell debris and scraps the inocula were centrifuged for 2.500 x g (5.500 rpm) during 10 minutes. After centrifugation, 1 mL of supernatant was collected and added to MDBK cells subcultured 24 hours before. The inocula and MDBK cell were incubated at 37°C with 5% CO₂ atmosphere for 1 hour. Then the inocula were removed and the cell monolayer was washed three times with PBS (phosphate buffered saline) and 10 mL of EMEM with 1% goat serum supplemented with antibiotics [500 µL/L enrofloxacin (Cultilab), 400 µL/L amphotericin B (Cristália)] were added. The MDBK cells were kept at 37°C and every 24h they were evaluated in search of cytopathic effect. After 7 days, the cell monolayers were frozen at -80°C until the next passage.

Extraction of total brain DNA

Fragments of brain of about 100 µg of tissue were placed in 1mL lysis buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM EDTA, 200 mM NaCl₂; 100 µg proteinase K; 10 % SDS; pH 8.0) and incubated for 1 hour at 56°C. Subsequently, the mixture was centrifuged at 12.000 x g for 10 min and 400µL of the supernatant were collected. After a standard phenol extraction (Sambrook & Russell, 2001) the purified DNA was precipitated in ethanol, washed and resuspended in 100 µL TE (10 mM Tris pH 7.4; 1 mM EDTA pH 8.0). To check for the quantity and quality of the obtained DNA, 5 µL were analyzed by agarose gel electrophoresis and compared with known quantities of phage lambda DNA (Fermentas).

Nested PCR

The primers used in the first round of amplification were based on the sequences of the glycoprotein C (gC) gene of both BoHV-1 and BoHV-5. The primers (PF2: 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3' and PR1: 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3') anneal to a region shared by both BoHV-1 and BoHV-5 and amplify a region of 575 and 572 bp, respectively (Esteves et al., 2008). The PCR was set up in 25 µL containing 1 mM

MgCl₂ (Invitrogen), 0.3 μM of each primer (IDT), 10% dimethylsulfoxide (DMSO; Acros Organics), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10% of PCR buffer (Invitrogen) and 0.6 mM deoxynucleoside triphosphates (ABgene) per reaction. To each reaction, 25 molecules of an internal control template (expected product length 440 bp; Campos et al., 2009) were added to detect false negative reactions. Reactions were performed in a thermal reactor (Eppendorf Mastercycler) under the following cycling conditions: 5 min at 94°C; followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 62°C, 1 min at 72°C; followed by 5 min at 72°C.

The nested reaction to differentiate between BoHV-1 and BoHV-5 was performed with two type-specific PCRs on the product of the first PCR as a template (see annex 2). To detect BoHV-1 DNA (see annex 4), the primer pair (PF 5'-CTAACATGGAGCGCCGCTT-3' and PR 5'-CGGGGCGATGCCGTC-3') was used, which is expected to give rise to a product of 161 bp. To detect BoHV-5 DNA, the primer pair (PF 5'-GTGGAGCGCCGCTTCGC-3' and PR 5'-TATCGCGGAGAGCAGGCG-3') was employed to amplify a product of 236 bp (see annex 4) (Campos et al., 2009). Each PCR was carried out in a total volume of 25 μL containing 1 mM MgCl₂, 0.2 μM of each primer forward, 10% DMSO (Acros Organics), 0.6 mM dNTPs (ABgene), 1x buffer and 1U of *Taq* polymerase (Invitrogen). The cycling conditions were: 95°C for 5 min followed by 35 cycles of 1 min 94°C, 1 min 61°C and 1 min 72°C and a final extension time of 5 min 72°C. To avoid contamination, separate rooms were designated to prepare the PCR buffers, to DNA extraction of brains tissues, and to the analyses of PCR products. Filter tips were used throughout. Work benches were decontaminated with ethanol 70% and UV light. Negative controls (water) were included in every three PCR reactions (Campos et al., 2009).

Statistical analysis

The results were analyzed using the Pearson Chi-Square in the program SPSS 17.0. The comparisons between BoHVs infected with rabies or non-infected with rabies were considered significant when $p < 0.05\%$.

RESULTS

BoHV isolation

After three blind passages in MDBK cells, no infectious virus was detected in the 101 cattle brain tissue samples examined in the present study.

Detection of BoHV-1 and BoHV-5 DNA in brain samples

In the first round of PCR only 38.6% of the samples (n=101) were positive for BoHV (see annex 3). Among all brain samples (n=101), 25.7% were positive for BoHV-1, 21.8% were positive for BoHV-5 and 29.7% were positive for both genomes (Table 1) (see annex 5). In rabies positive brains, the highest percentage of positive samples, 41% (16/39), was of BoHV-1 and BoHV-5 co-infections (see annex 6). In rabies negative brains, infections with BoHV-1, 27.4% (17/62) (see annex 7), were the most frequent. The prevalences found in the positive and negative rabies groups, when compared with presence or absence of BoHVs, were not statistically significant. These results demonstrated that the protocol used allows differentiation between these two viruses, based on the extension of the product and, although BoHV-1 and BoHV-5 infections are in fact widespread in cattle, these do not seem to contribute significantly to the cases where rabies is suspected as the cause of encephalitis.

TABLE 1: Results of the nPCR for BoHV-1 and 5 DNA detection from brain tissues of animals submitted to rabies diagnosis (n=101).

	BoHV-1 and 5 DNA amplification from brain tissues				Total
	Negative	BoHV-1	BoHV-5	BoHV-1 and 5	
Results *	23 (22.8 ^b)	26 (25.7 ^b)	22 (21.8 ^b)	30 (29.7 ^b)	101 ^a
Rabies positive *	8 (20.5 ^c)	9 (23.1 ^c)	6 (15.4 ^c)	16 (41.0 ^c)	39 (38.6)
Rabies negative *	15 (24.2 ^d)	17 (27.4 ^d)	16 (25.8 ^d)	14 (22.6 ^d)	62 (61.4)

*There are no statistically significant differences between all groups;

a. The subtype specific nPCRs were accomplished using the products of the BoHV positive samples as templates;

b. The percentage refers to the overall results (n=101);

c. The percentage refers to the total results for samples positive for rabies (n=39);

d. The percentage refers to the total results for samples negative for rabies (n=62);

DISCUSSION

Whenever rabies virus is searched, in most diagnostic laboratories no other agents are routinely investigated in the examined samples (Spilki et al., 2003). Therefore, if the cause of neurological disease frequently remains undetermined. However, the establishment of a conclusive diagnosis has become specially relevant, particularly to define a precise differential diagnosis of BSE (Claus et al., 2002). As BoHV-1 and BoHV-5 are widely disseminated in Brazilian cattle, it would be interesting to examine whether these would have any correlation with the occurrence of rabies. However, as herpesviruses are able to establish latent infections, it would be interesting to compare the occurrence of productive and latent infections in rabies suspect cases. A few studies have dealt with the detection of bovine herpesviruses in animals submitted to rabies diagnosis (Pinto et al., 2000; Spilki et al., 2003; Batista et al., 2007). In the present work, a search was made to detect possible correlations between the occurrence of rabies, BoHV-1 and BoHV-5 in 101 brains of cattle suspected of rabies infection due to neurologic signs displayed before death. Out of these, 62 were negative and 39 were positive at rabies diagnosis. When submitted to three blind passages in cell culture for BoHV isolation, none of the brain samples showed infectious virus. Recently, Batista et al. (2010), analyzing 70 brain samples of bovines sent to rabies diagnosis isolated BoHV-1 from two samples, one of these also positive for rabies. Likewise, Silva et al. (2007) were able to isolate BoHV-1 from five out of 26 brain samples of bovines from which typical herpesvirus CPE was visualized.

Other 21 isolates recovered from brains were identified as BoHV-5. Roels et al. (2000) were able to isolate BoHV-1 from the brain of an adult cow showing typical signs of CNS disease. On the other hand, Spilki et al (2003) isolated and characterized BoHV-5 from the brain of a rabies infected calf. Rissi et al. (2008), in 11 cases of bovine herpetic meningoencephalitis in Southern Brazil, diagnosed 7 cases by BoHV-5 and 4 cases caused by BoHV-1. On the other hand, Claus et al. (2007) were able to isolate 18 BoHV-5 isolates from 47 brain samples with meningoencephalitis. However, those studies report rather different prevalences for active BoHV infections in rabies suspect cases. In the present study, the lack of infectious virus in all the samples show that either the bovine herpesviruses played no role at all in the neurological signs of these animals during the acute disease; or at least part of these samples are actually false negative. In this case, inappropriate storage conditions could influence the amount of infectious viruses in the brain tissues, especially if the viral load was low from the start. Another cause of false negative results is that the region used to prepare the tissue macerate for the virus isolation did not contain enough infectious virus particles to be isolated in cell culture. However, to avoid false negative results, as soon as the samples arrived in the laboratory they were stored at -70°C .

When nested PCRs that amplify and differentiate BoHV-1 from BoHV-5 DNA were directly applied in these brain tissues, 25.74% of the samples tested here were positive for BoHV-1 DNA, while 21.78% were positive for BoHV-5. DNA from both viruses was detected in 29.7%. When the results of the nPCRs were compared with the detection of rabies virus, no statistically significant correlation was found.

Recent reports on the detection of BoHV-1 and 5 DNA in brains of rabies negative cattle with meningoencephalitis showed the presence of BoHV-5 DNA in 30/47 (Claus et al., 2007) and in 28/76 (Arruda et al., 2010). None of the samples tested by these authors was positive for BoHV-1 DNA. The differences between the results described in our study and the ones described previously may be explained by differences in sensitivity of the PCRs. The nPCR used here detects between 25 and 2.5 DNA molecules (Campos et al. 2009). The sensitivity of the PCR used by Claus et al. (2005) and Arruda et al. (2010) was calculated based on serial dilutions of BoHV-5 and 1 viral isolates and it was able to detect viral DNA in the dilutions containing 50 and 5 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀), respectively (Claus et al. 2005). Because serial dilutions of infectious viruses may contain DNA molecules of inactivated viruses,

it is likely that the nPCR described here is more sensitive than that of Claus et al. (2005, 2007).

Approximately 37% of the animals tested here were up to 24 months old, and 62.34% animals were over 24 months old. Older animals show higher frequencies of BoHV infections because they have more chances to get in contact with different sources of infection during their reproductive lives. The large number of old animals tested here may, consequently, have influenced in the frequency of DNA positive samples found here.

BoHV-5 has more frequently associated with neurological disease of cattle than BoHV-1 (Rissi et al., 2007, Salvador et al., 1998, Silva et al., 2007, Belknap et al., 1994, d'Offay et al, 1993). BoHV-5 is neuropathogenic and easily invades the CNS, being able to cause acute meningoencephalitis when it reaches the brains through the olfactory and trigeminal pathways. This virus can be recovered from several brain regions (olfactory bulb, olfactory cortex, anterior cortex, dorso-lateral cortex, posterior cortex, cerebellum, thalamus, midbrain, pons, medulla oblongata, cervical medulla and trigeminal ganglia) with high to moderate titres after an acute infection (Vogel et al., 2003). On the other hand, BoHV-1 is less neurovirulent and neuroinvasive than BoHV-5. However, although latent infection of BoHV-1 was rarely detected in neural areas beyond trigeminal ganglia (Carrillo et al., 1983a; Perez, et al., 2002; Vogel et al., 2003; Del Médico Zajac et al., 2010), Storts (1998) suggested that when BoHV-1 is associated with bovine meningoencephalitis it replicates in neurons, astrocytes and oligodendrocytes, similar to what happens with BoHV-5 meningoencephalitis. It is possible that, like BoHV-5 (Vogel et al., 2003), following an acute infection, BoHV-1 is able to establish latent/persistent infection in different regions of the brains.

Molecular techniques like PCR or *in situ* hybridization are known as very sensitive techniques that have the advantage to detect viral nucleic acids in tissue samples that are inappropriate for virus isolation. On the other hand, especially in the case of herpesviruses infections, PCR may not be the best choice in the diagnosis of acute disease because they are not able to differentiate between acute and latent infections. Based on this knowledge, and taking into account that no infectious virus could be isolated from these samples, we might assume that at least part of the samples tested here came from animals which were developing a latent phase of a herpesvirus infection at the time of death.

In summary, our results are suggestive of a natural high frequency of latent/persistent infections by both BoHV-1 and 5 in brains of cattle. Despite this, we are not able to confirm they were the causative agents of encephalitis in the samples tested, as it was not possible to isolate virus in its infectious form, thus we can only suggest a latent infection in the animals involved with neurological signs whose primary suspicion was rabies. The characterization of a latent infection by alphaherpesviruses is linked to the detection of latency related transcripts (LAT) mRNA from the tissue sample, which will be the subject of future investigations by our group.

Acknowledgements:

To Samuel Paulo Cibulski for help with the statistical analysis. Financial support from CNPq, FAPERGS, CAPES, and the State Government of Rio Grande do Sul. During this work, Kunert Filho, H.C. was a M.Sc. fellow at the Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Campos, F.S. is doctorate fellow of PPGCV/UFRGS. Lima, F.E.S. is on receipt of a M.Sc. grant from Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente PPGMAA/UFRGS. Roehle, P.M. is a CNPq 1B research fellow, Franco, A.C. is a CNPq 2 research fellow and Rijsewijk, F.A.M. is a CNPq visitor research fellow. Dr^a. Wíllia D. Brito is Professor at the Veterinary School of the Universidade Federal de Goiás (UFG).

REFERENCES

- Almeida, M.B., Tortelli, F.P., Riet-Correa, B., Ferreira, J.L.M., Farias, N.A.R., Riet-Correa, F., Schild, A.L. 2006. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesq. Vet. Bras.*, 26(4):237-242.
- Arruda, L.P., Nakazato, L., Dutra, V. Lemos, R.A.A., Nogueira, A.P.A, Cruz, Raquel, A.S., Pescador, C.A., Colodel, E.M. 2010. Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalos conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica. *Pesq. Vet. Bras.*, 30(8):646-650.
- Ashbaugh, S.E., Thompson, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S., Collins, J.K., 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, p.387–394.
- Barros, C.S.L., Driemeir, D., Pilati, C., Barros, S.S., Castilhos, L.M. Senecio spp poisoning in cattle in southern Brazil. 1992. *Vet. Hum. Toxicol.*, 34(3):241-246.

- Barros C.S.L., Driemeier, D., Dutra, I.S., Lemos R.A.A. 2006. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. 1ª Ed. Vallée.
- Batista, H.B.C.R.; Schmidt, E.; Spilki, F.R.; Franco, A.C.; Roehe, P.M. 2010. 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.5, p.1023-1028.
- Belknap, E.B., Collins, J.K., Ayers, V.K., Schultheiss, P.C. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Pathol.*, 31, p.358–365.
- Beltrão, N., Flores, E.F., Weiblen, R., Silva, A.M., Roehe, P.M., Irigoyen, L.F. 2000. Acute infection and neurological disease by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5): rabbits as experimental model. *Pesq. Vet. Bras.*, 20:144–150.
- Bennett, R., Ijpelaar, J. 2003. Economic Assessment of Livestock Diseases in Great Britain. The University of Reading.
- Campos, F.S., Franco, A.C., Hübner, S.O., Oliveira, M.T., Silva, A.D., Esteves, P.A., Roehe, P.M., Rijsewijk, F.A.M. 2009. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.*, 139:67-63.
- Carrillo, B.J., Pospischil, A., Dahme, E. 1983a. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 30, p.161–168.
- Carrillo, B. J., Ambrogi, A., Schudel, A.A., Vasquez, M., Dahme, E., Pospischil, A. 1983b. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 30:327–332.
- Chowdhury, S.I. 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology*, 213:558–68.
- Claus, M.P., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A. 2002. Herpesvírus bovino tipo 5 e meningoencefalite herpética bovina. *Semina Ciênc. Agrar.*, v. 23, n.1, p.131-141.
- Claus, M. P.; Alfieri, A. F.; Folgueras-Flatschart, A. V.; Wosiacki, S. R.; Medici, K. C.; Alfieri, A. A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods.*, v.128, n.1-2, p.183-188.
- Claus, M.P.; Alfieri, A.F.; Médici, K.C.; Lunardi, M.; Alfieri, A.A. 2007. Bovine herpesvírus 5 detection by virus isolation in cell culture and multiplex-pcr in central nervous system from cattle with neurological disease in Brazilian herds. *Braz. J. Microbiol.*, 38, p.485-490.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., Mcgeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E. 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.*, 154, p.171–177.

- Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P. 1996. The fluorescent antibody test. In: Laboratory techniques in rabies. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski (Eds). 4th ed. World Health Organization, pp.88-95.
- Del Médico Zajac, M.P.; Ladelfa, M.F.; Kotsias, F.; Muylkens, B.; Thiry, J.; Thiry, E.; Romera, S.A. 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet. J.*, v.184, p.138-145.
- d'Offay, J.M., Mock, R.E., Fulton, R.W. 1993. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.*, 54, p.534–539.
- Ely, R.W., d'Offay, J.M., Ruefer, A.H., Cash, C.Y. 1996. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffinembedded brain tissue. *J. Vet. Diag. Invest.*, 8, p.487–492.
- Esteves, P.A., 2007. Análise da região carboxi-terminal da glicoproteína c(gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1(BoHV-1) e 5 (BoHV-5). Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva/Virologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 88.
- Esteves, P.A., Dellagostin, O.A., Pinto, L.S., Silva, A.D., Spilki, F.R., Ciacci-Zanella, J.R., Hübner, S.O., Puentes, R., Maisonnave, J., Franco, A.C., Rijsewijk, F.A.M., Batista, H.B.C.R., Teixeira, T.F., Dezen, D., Oliveira, A.P., David, C., Arns, C.W., Roehe, P.M., 2008. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Res.*, 131, p.16–22.
- Furuoka, H., Izumida, N., Horiuchi, M., Osame, S. 1995. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol.*, 90, p.565–571.
- Gonçalves M.A.S., Neto R.S., Brazil T.K. 2002. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35: 461-464.
- Gomes, L.I.; Rocha, M.A.; Souza, J.G.; Costa, E.A.; Barbosa-Stacioli, E.F. 2003. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: Amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet. Res. Commun.*, 27, p.495–504.
- Kahrs, R.F. 2001. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: Kahrs, R.F. (Ed.), *Viral Diseases of Cattle*. Iowa State University Press, p.159–170.
- Kunrath, C.F., Vogel, F.S.F., Oldoni, I., Flores, E.F., Weiblen, R., Dezingrini, R., Torres, F.D., Pan, K.A. 2004. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). *Ciênc. Rural*, 34:1877-1883.

- Lilenbaum, W., Morais, Z.M, Gonçalves, A.P., Souza, G.O., Richtzenhain, L., Vasconcellos, S.A. 2007. First isolation of leptospires from dairy goats in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.38, n3, p.507-510.
- Lemos, R.A.A., Brum, K.B., Bernardo, K.C., Katayama, K.A., Mori, A.E., Bonilha, M.M., Cavallero, J.C.M. 1998. Aspectos epidemiológicos das principais enfermidades caracterizadas por sintomatologia nervosa em bovinos, diagnosticadas no Mato Grosso do Sul. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. Relatório de Bolsa de Iniciação Científica do CNPq. 16 p.
- Loretti, A.P., Colodel, A.M., Driemeir, D., Correa, A.M., Bangel Jr., J.J., Ferreira, L. Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. 2003. *J. Vet. Diagn. Investig.* v.15, 2, p.123-132.
- Magyar, G., Tanyi, J., Horny' AK, A., Bartha, A. 1993. Restriction endonuclease analysis of Hungarian and bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. *Acta Vet. Hung.*, 41, p.159–170.
- Meyer, G., Lemaire, M., Ros, C., Belak, K., Gabriel, A., Cassart, D., Coignoul, E., Belak, S., THIRY, E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.* 146:633–652.
- Meyer, G., Lemaire, M., Ros, C. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus type1 and 5. *Arch. Virol.* v.146, p.633-652.
- Oldoni, I., Weiblen R., Inkelmann, M.A. Flores, E.F. 2004. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37:213-221.
- Penny, C.D., Howie, F., Nettleton, P.F., Schock, A. 2002. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. *Vet. Rec.*, 151:89-91.
- Perez, S. E., Bretschneider, M.R., Leunda, F.A., Osorio, E.A., Flores, E.F., Odeon, A.C. 2002. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.*, 39:437–444.
- Perez, S.E., Vagnozzi, A., Sur, J.H., Odriozola, E., Campero, C.M., Odeón, A.C. 2003. Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. *Ver. Argent. Microbiol.*, 35, p.69–73.
- Pinto, A.M.V., Romijn, P.C., Silva, R.C.F., Silva, T.C., Alfieri, A.A., Martins, L.L., Weiblen, R., Roehe, P.M., Portes, S.A.R., Leite, J.P.G. 2000. Isolation and identification of herpesviruses in brains of calves with negative rabies diagnosis. XI Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, 25-29 Nov. *Virus Ver. Res.* 5 (Suppl. 1):122. (Abstract).

- Storts, R.W. 1998. Sistema Nervoso Central In: Carlton, W.W; Mcgavin, M.D. Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2ª ed. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 353-416.
- Riet-Correa, F., Riet-Correa, G., Schild, A.L. 2002. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e equídeos. *Pesq. Vet. Bras.*, 22(4):161-168.
- Rissi, D.R.; Rech, R.R., Flores, E.F.; Kommers, G.D.; Barros, C.S.L. 2007. Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5. *Pesq. Vet. Bras.*, 27(7):251-260.
- Rissi, D.R.; Pierezan, F.; Silva, M.S.; Flores, E.F.; Barros, C.S.L. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with *Bovine herpesvirus* infection. *J. Vet. Diagn. Inves.*, 20:346-349.
- Rodrigues, A.L., Rech, R.R., Barros, R.R., Figuera, R.A., Barros, C.S.L. 2005. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. *Ciênc. Rural*, v.35, n.1, p.121-125.
- Roels, S., Charlier, G., Letellier, C., Meyer, G., Schynts, F., Kerkhofs, P., Thiry, E., Vanopdenbosch, E. 2000. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.*, 146, p.586–588.
- Roehe, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, L.G., Rosa, J.C.A. 1997. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV-1) e vírus da encefalite bovina (BoHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.*, v.17, n.1, p.41-44.
- Roizman, B. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123, 425–449.
- Ros, C., Belak, S. 2002. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, 24, p.99–105.
- Salvador, S.C.; Lemos, R.A.A.; Riet-Correa, F.; Roehe, P.M.; Osório, L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.18, p.76-83.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanches, A.W.D.; Langohr, I.M.; Stigger, A.L.; Barros, C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.113-118.
- Silva, M.S., Brum, M.C., Loreto, E.L., Weiblen, R., Flores, E.F. 2007a. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.*, 129, 191–199.
- Silva, M.S.; Brum, M.C.; Weiblen, R.; Flores, E.F. 2007b. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesq. Vet. Bras.*, 27(10):403-408.

- Spilki, F.R., Franco, A.C., Teixeira, M.B., Esteves, P.A., Schaefer, R., Schmidt, E., Lemos, R.A., Roehe, P.M. 2003. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. *Pesq. Vet. Bras.*, v.23, n.1, p.1-4.
- Suarez Heinlen, A., Metzler, A.E., Weiblen, R., Berrios, P., Schudel, A.A., Rodriguez, M. 1993. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *J. Vet. Med. B*, 40, p.125–130.
- Summers, B., Cummings, J.F., De Lanhunta, A. eds.: 1995. Inflammatory diseases of the central nervous system. In: *Veterinary neuropathology*, p.95–188.
- Teixeira, M.F.B., Esteves, P.A., Schmidt, C.S.R., Dotta, M.A., Roehe, P.M. 2001. Elisa de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1). *Pesq. Vet. Bras.*, 21(1):33-37.
- Vogel, F.S.F., Flores, E.F., Weiblen, R., Kunrath, C.F. 2002. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciênc. Rural*, 32:881-883.
- Vogel, F.S., Caron, L., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Mayer, S.V., Bastos, R.G., 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.*, 41, p.4512–4520.
- Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock R. D., Jeffrey M., Dawson, M., Bradley R. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 121:419-420.

3. CONCLUSÕES

A técnica de PCR tem grande importância no diagnóstico diferencial nas enfermidades que acometem o sistema nervoso central dos bovinos. O isolamento viral juntamente com a técnica de PCR é de suma importância para o correto diagnóstico de encefalites virais em bovinos relacionadas ao herpesvírus bovino.

Os resultados devem ser interpretados com cuidado, pois presença de DNA viral somente com indicativo de manifestação de sinais neurológicos, sem o isolamento concomitante dos agentes pode não indicar infecção aguda por herpesvírus bovino.

A presença do DNA de BoHV-1 ou BoHV-5 em encéfalos positivos para raiva demonstra a real importância da análise cautelosa de resultados positivos para BoHVs na PCR, pois se mal interpretados, estes resultados podem interferir no diagnóstico para outras enfermidades neurológicas e com alto potencial zoonótico como é o caso da raiva.

Nesse estudo uma PCR semi quantitativa foi utilizada para detectar o DNA de BoHV-1 e BoHV-5 em encéfalos de 101 bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul. O DNA de BoHV foi detectado em 38% dos encéfalos analisados. A prevalência do DNA de BoHV-1 e BoHV-5 nos rebanhos brasileiros pode ser ainda maior, e isso nos leva a questionar a real prevalência de animais infectados latentemente e propor o desenvolvimento de métodos mais sensíveis na identificação destes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M. & ENGELS, M. Pro and contra-IBR eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.293-302, 2006.
- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chains reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.48, p.613-621, 2001.
- ANDRADE, G.I. **Diagnóstico sorológico do Herpesvirus bovino 1 e 5: Proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANIMAL HEALTH AUSTRALIA. 2007, Ed. Biotext, Canberra, Australia, 2008. Disponível on-line em: <http://www.animalhealthaustralia.com.au/ahc/index.cfm?F220A69A-C79B-07C7-B0ED-56BE52309051> Acesso em: dezembro de 2010.
- ANTINONE, S.E.; SHUBEITA, G.T.; COLLER, K.E.; LEE, J.I.; HAVERLOCK MOYNS, S.; GROSS, S.P.; SMITH, G.A. The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. **Journal of Virology**, v.80, p.5494-5498, 2006.
- ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, 387-394. 1997.
- BAGUST, T. J.; CLARK L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, 82:375-383. 1972.
- BANERJEE, A.K. Transcription and replication of rhabdoviruses. **Microbiology Reviews**, 52: 66-87. 1987.
- BANKS, M.; IBATA, G.; MURPHY, A.M.; FROSSARD, J.P.; CRAWSHAW, T.R.; TWOMEY, D.F. Bovine lymphotropic herpesvirus and non-responsive post-partum metritis in dairy herds in the UK. **The Veterinary Journal**, 176(2):248-50. 2008.
- BARANOWSKI, E.; KEIL, G.; LYAKU, J.; RIJSEWIJK, F.A.; VAN OIRSCHOT, J.T.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.91-101, 1996.
- BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.35(6), p.1368-1373. 2005.
- BARENFUS, M.; DELLIQUADRI, C.A.; McINTIRE, R.W.; SCHROEDER, R.J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with

meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 143:725-755. 1963.

BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. **Procedimentos para o Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos**. Departamento de Defesa Animal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), p.1-50. 2003.

BARROS C.S.L., DRIEMEIER, D., DUTRA I.S., LEMOS R.A.A. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. 1^a Ed. **Vallée**. 2006.

BARTHA, A.; JUHA'SZ, M.; LIEBERMANN, H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, 16, 357-358. 1966.

BARTHA, A. *et al.* Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum**, v.19, p.145-151, 1969.

BATISTA, H.B.C.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, 35(2): 125-144, 2007.

BATISTA, H.B.C.R.; SCHMIDT, E.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesvirus 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. **Canadian Veterinary Journal**, 16:269-271. 1975.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v.31, n.3, p.358-365, 1994.

BENNETT, R.; IJPELAAR, J. Economic Assessment of Livestock Diseases in Great Britain. **The University of Reading**. 2003.

BORDIGNON, J.; PIZA, A.T.; ALVAREZ-SILVA, M.; CAPORALE, G.M.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I.; ZANETTI, C.R. Isolation and replication of rabies virus in C6 rat glioma cells (clone CCL-107). **Biologicals**, 29: 67-73. 2001.

BORDIGNON, J.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R. Molecular detection and characterization of rabies virus in Brazil: new approaches for epidemiology and surveillance. **Virus Reviews and Research**, 10: 14-22. 2005

BRAKE, F.; STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v.62, p.331-334, 1985.

BRATANICH, A.C.; SARDEI, S.I.; SMITSAART, E.N.; SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.38(1): 41-8. 1991.

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus in: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Ed. UFSM, cap.3, p.59-86. 2007.

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

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. High prevalence of co-infections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.67-73. 2009.

CÁRDENAS, A.B.; ARANGO, C.J.J.; MAYA, J.J.M.; HIROSE, J.A.M.; BERNAL, A.O. Comparison between three diagnostic tests to detect abortion caused by infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds. **Veterinaria México**, v.37, n.2, p.151-163, 2006.

CARINI, A. Sur une grande epizootie de rage. **Annales de L'Institut Pasteur**, 25 : 843-846. 1911.

CARNIELI, P.; BRANDÃO, P.E.; CARRIERI, M.L.; CASTILHO, J.G.; MACEDO, C.I.; LINDENBERG, M.M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R.C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, 120: 113-120. 2006.

CARRIERI, M.L.; FAVORETTO, S.R.; CARNIELLI JR.P.; PEIXOTO, Z.M.P.; ACHKAR, S.; PAIVA, J.P.R.C.; KOTAIT I. Canine and feline rabies in the Espírito Santo do Pinhal City, São Paulo, transmitted by bats. **Virus Reviews and Research**, 6: 176. 2001.

CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B**, 30: 161-168. 1983a.

CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinarmedizin Reihe B**, 30, 327–332. 1983b.

CASCIO, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; AMES, A.D.; COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11(2): 29-41. 1999.

- CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and neurovirulent BoHV-5. **Virology**, 213:558–568. 1995.
- COLL, J.M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. **Archives of Virology**, 140: 827-851. 1995.
- COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, J.A.F.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, 32 (2): 293-298. 2002.
- COX, J.H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L.G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. **Infection and Immunity**, 16: 754-759. 1997.
- D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.4, p.315-324, 2002.
- DAVIES, M.C.; ENGLERT, M.E.; SHARPLESS, G.R.; CABASSO, V.J. The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. **Virology**, 21: 642-651. 1963.
- DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, 154, 171–177. 2009.
- DEBIASI, R.L. & TYLER, K.L. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p.903-925, 2004.
- 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, 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, 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.
- DERIVEDDY, C.W.; JONES, C. Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields was containing unique open reading frames. **Journal of Virology**, v.72, p.7294-7301, 1998.

D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.4, p.534-539, 1993.

DIAS, L.E.; MAISONNAVE, J.; GUARINO, H.; PAULLIER, C.; PERDOMO, E.; FIGARES, A.; IZAGUIRRE, R. Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) descripción de um cuadro clínico em terneros de tambo. In: **III Congresso Nacional Veterinária**, Montevideo. Sociedad de Medicina Veterinaria Del Uruguay, p.521-530. 1982.

DIEL, D.G.; FONSECA, E.T.; SOUZA, S.F.; MAZZANTI, A.; BAUERMANN, F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. O herpesvirus 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(3), p.164-170. 2005.

DOHNER, K.; WOLFSTEIN, A.; PRANK, U.; ECHEVERRI, C.; DUJARDIN, D.; VALLEE, R.; SODEIK, B. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.2795-2809, 2002.

ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvirus 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.; GIULIANI, C.; WILD, P.; BECK, T.M.; LOEPFE, E.; WYLER, R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v.6, n.1, p.57-73, 1986.

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

ENQUIST, L.W.; TOMISHIMA, M.J.; GROSS, S.; SMITH, G.A. Directional spread of an α -herpesvirus in the nervous system. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.5-16, 2002.

ESTEVEZ, P. A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C. ; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Veterinary Record**, v. 152, n. 21, p. 658-659, 2003.

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

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; DEZENGRINI, R.; ALMEIDA, S.R.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(1):1-16, 2009.

FLORES, E. F., TOBIAS F. L. **Métodos de Diagnóstico**. Diagnóstico Viroológico (3): Isolamento Cultivo Celular, p. 15. (5): Isolamento em animais, p. 35. (7):

Imunofluorescência direta, p. 37. (8): Imunoperoxidase, p. 40. (11): PCR, p. 46. (13): Soroneutralização, p. 47. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/sv/>>. Acesso em: janeiro de 2011.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. 2007. Herpesviridae. In: Flores, E.F., **Virologia Veterinária**, Ed. UFSM, cap.17, p.436, 2007.

FRENCH, E.L. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) vírus and a virus isolated from calves with encephalitis. **Australian Veterinary Journal**, 38, 555–556. 1962.

FUCHS, M.; HÜBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA, H.J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wildtype virus and virus lacking glycoprotein E. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2498-2507, 1999.

GEISER, V.; ZHANG, Y.; JONES, C. Analysis of a bovine herpesvirus 1 recombinant virus that does not express the bICP0 protein. **Journal of General Virology**, v.86, p.1987-1996, 2005.

GERAGHTY, R.J.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. **Science**, v.280, p.1618-1620, 1998.

GERDTS, V.; BEYER, J.; LOMNICZI, B.; METTENLEITER, T.C. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. **Journal of Virology**, v.74, p.817-827, 2000.

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**, 54 (2):217-220. 2002.

GUARINO, H.; NÚÑEZ, A.; REPISO, M.V.; GIL, A.; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v.85, p.34-40, 2008.

GUEDES, K.M.R.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A.F.M.; SIMÕES, S.V.D.; MIRANDA NETO, E.G.; NOBRE, V.M.T.; MEDEIROS, R.M.T. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27: 29-38. 2007.

HALFEN, D.C.; RIET-CORREA, F. Infecções por Herpesvírus Bovino-1 e Herpesvírus Bovino-5. p.126-137. In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Lemos, R.A.A.; Borges, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. Vol. 2, 3ª ed. Pallotti. 2007.

HINKLEY, S.; AMBAGALA, A.P.; JONES, C.J.; SRIKUMARAN, S. A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. **Archives of Virology**, v.145, n.2027-2046, 2000.

HIPÓLITO, O. **Raiva**. In: Doenças dos Animais Transmissíveis ao Homem. Serviço de Informação Agrícola, Ministério da Agricultura, 90: 31-37. 1948.

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

HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.28, p.187-196, 2005.

ICTVDB MANAGEMENT. 00.031.1.02. Varicellovirus. In: ICTVdb - The Universal Virus Database. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. v.4, 2006. Disponível on-line em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/> Acesso em: dezembro de 2010.

ISENI, F.; BARGE, A.; BAUDIN, F.; BLONDELL, D.; RUIGROK, R.W.H. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. **Journal of General Virology**, 79: 2909-2919. 1998.

JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C.; MCGAVIN, M.D. Viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, 207-215. 1962.

JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PEREZ, S.; ZHANG, Y.; Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.199-210, 2006.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v.8(2), p.187-205. 2008.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.171(10): 1055-64. 1977.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: **Viral diseases of cattle**, pp. 159-170. 2001.

KING, A. A. & TURNER, G.S. Rabies: A review. **Journal of Comparative Pathology**, 108:1-39. 1993.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Records**, v.165, 7 p.111-113, 2009.

KNIFE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B. **Field's virology**, USA, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p.-2381-2510, 2001.

KOTAIT, I. Infecção de morcegos pelo vírus da raiva. **Boletim do Instituto Pasteur**, 1: 51-58. 1996.

KUPFERSCHMIED, H.U.; KIHM, U.; BACHMANN, P.; MÜLLER, K.H.; ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report, **Theriogenology**, 25:439–443. 1986.

LEMONS, R.A.A.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C.; KATAYAMA, K.A.; MORI, A.E.; BONILHA, M.M.; CAVALLERO, J.C.M. **Aspectos epidemiológicos das principais enfermidades caracterizadas por sintomatologia nervosa em bovinos, diagnosticadas no Mato Grosso do Sul**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. Relatório de Bolsa de Iniciação Científica do CNPq. 16 p. 1998.

LI, Y.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L.A.; LIANG, X., Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **Journal of Virology**, v.69, p.4758-4768, 1995.

LIANG, X.; PYNE, C.; LI, Y.; BABIUK, L.A.; KOWALSKI, J. Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. **Virology**, v.207, n.429-441, 1995.

LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 25(3):425-430. 1995.

MAPA (2005). Boletim da Defesa Sanitária Animal, DSA, SDA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,3271386&_dad=portal&_schema=PORTAL Acesso em: dezembro de 2010.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; VAN MAANEN, C.; HAGE J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions, **Veterinary Microbiology**, v.76, p.1–13, 2000a.

MARS, M.H.; RIJSEWIJK, F.A.M.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; HAGE, J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Presence of bovine herpesvirus 1 gB-seropositive but gE-seronegative Dutch cattle with no apparent virus exposure. **Veterinary Record**, v.147(12): 328-31. 2000b.

MENDONÇA F.S.; DÓRIA R.G.S.; SCHEIN F.B.; FREITAS S.H.; NAKAZATO L.; BOABAID F.M.; PAULA D.A.J.; DUTRA V. & COLODEL E.M. Febre catarral maligna em bovinos no Estado de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 28(3):155-160. 2008.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, 76, n.4, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.423-429, 2006.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus Assembly: an update. **Virus Research**, v.143, p.222-234. 2009.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, n.3-4, p.205-217, 1986.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; LYAKU, J. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. **Veterinary Microbiology**, 51:27-40. 1996.

MEYER, G.; HANON, E.; GEORLETTE, D.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. **Journal of General Virology**, v.79, p.1983-1987, 1998.

MEYER, G.; BARE, O.; THIRY, E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General Virology**, v.80, p.2849–2859. 1999.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146(4): 633-52. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. **Raiva Humana** - Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada: Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_2006.pdf Acesso em: janeiro de 2011.

MISRA, V.; WALKER, S.; HAYES, S.; O'HARE, P. The bovine Herpesvirus a gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its Herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. **Journal of Virology**, v.69, n.9, p.5209-5216, 1995.

MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.145-153. 2000.

MORETTI, B.; ORFEI, Z.; MONDINO, G.; PERSECHINO, A. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. **Veterinaria Italiana**, v.15, 676–702. 1964.

MURANYI, W.; HAAS, J.; WAGNER, M.; KROHNE, G.; KOSZINOWSKI, U.H. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. **Science**, 297, 854–857. 2002.

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

MWEENE, A. S.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.44, p.165-174, 1996.

PARK, R.; BAINES, J.D. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. **Journal of Virology**, 80, 494–504. 2006.

PAULA, 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**, 57(1):2. 2005.

PENNY, C.D.; HOWIE, F.; NETTLETON, P.F. & SCHOCK, A. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. **Veterinary Record**, 151:89-91. 2002.

PEREZ, S.E.; BRETSCHNEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F.; ODEON, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v.39, pp. 437–444. 2002.

PEREZ, S.E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J.H.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C.M.; ODEÓN, A.C. Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. **Revista Argentina de Microbiología**, v.35, 69–73. 2003.

PIDONE, C.L.; GALOSI, C.M.; ECHEVERRIA, M.G.; NOSETTO, E.O.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Restriction Endonuclease Analysis of BHV-1 and BHV-5 Strains Isolated in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, n.7, p.453-456, 1999.

PINTO, A.M.V.; ROMIJN, P.C.; SILVA, R.C.F.; SILVA, T.C.; ALFIERI, A.A.; MARTINS, L.L.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P.M.; PORTES, S.A.R.; LEITE, J.P.G. Isolation and identification of herpesviruses in brains of calves with negative rabies diagnosis. XI Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, 25-29 Nov. **Virus Reviews and Research**, 5 (Suppl. 1):122. 2000.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD D.C.; HINCHCLIFF, W. **Veterinary Medicine. A textbook of diseases of cattle, sheep, goats and horses**. 9th edition. WB Saunders. 2000.

REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo. 1^a ed. Editora Roca, 642 p. 2000.

REBORDOSA, X.; PINOL, J.; PEREZ-PONS, J.A.; LLOBERAS, J.; NAVAL, J.; SERRA-HARTMANN, X.; ESPUNA, E.; QUEROL, E. Glycoprotein E of bovine

herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Research**, v.45, p.59-68, 1996.

REED, D.E.; BICKNELL, E.J.; BURY, R.J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.163, 753–755. 1973.

REYNOLDS, A.E.; LIANG, L.; BAINES, J.D. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. **Journal of Virology**, v.78, p.5564-5575, 2004.

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

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão. **Ciência Rural**, 26:323-332. 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 polioencefalomalacia causadas por Herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 26(1):44-46. 2006.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F., *et al.*: Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27:251–260. 2007.

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**, 26:123-132. 2006.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e herpesvírus da encefalite bovina com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, p.41-44, 1997.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, 146, 586-588. 2000.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-448, 1992.

ROIZMAN, B.; KNIPE, M. D. Herpes simplex virus and their replication. In *Fields Virology*, 4th Ed. Lippincott Williams and Wilkins publishers, 2001.

ROIZMAN, B.; PELLET, P.E. The family *Herpesviridae*: A brief introduction, in: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, Philadelphia-USA, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v.1, cap. 71, p.2399-2461, 2001.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of B-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SALVADOR, C.S.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, 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**, 18(2):76-83. 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**, 20(3):113-118, jul./set. 2000.

SAYDAM, O.; STEINER, F.; VOGT, B.; SCHWYZER, M. Host cell targets of immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.185-192. 2006.

SCHAEFER, R.; CALDAS, E.; SCHMIDT, E.; KING, A.A.; ROEHE, P.M. First case of cat rabies in Southern Brazil for 11 years. **Veterinary Record**, 150: 216-217. 2002.

SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; HÜBNER, S.O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A.P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P.M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, v.24, p.3313-3320, 2006.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.; LORETO, E.L.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, 129, 191-199. 2007.

SILVA, L.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1471-1474, 2007.

SMITH, J.S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of diseases in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, 9: 166-176. 1996.

SMITH, G.A.; GROSS, S.P.; ENQUIST, L.W. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.3466-3470, 2001.

SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; FRANCO, A.C.; LIMA, M.; HOLZ, C.L.; BATISTA, H.B.R.; DRIEMEIER, D.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P.M. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 22(2):58-63. 2002.

- STILWELL, G; MATOS, M.; CAROLINO, N. Seroprevalence of antibodies to four respiratory viruses in beef herds of the Ribatejo region of Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, n.561-562, p.97-105, 2007.
- STORCH, G.A. Diagnostic Virology. In: KNIPE, D. M. & HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4th ed. By Lippincott Williams & Wilkins Publisher. Chapter 18, pp.411 and 418, two volumes. 2001.
- STORTS, R.W. Sistema Nervoso Central In: CARLTON, W.W; MCGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2^a ed. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 353-416. 1998.
- STUDDERT, M.J.; BRAKE, F.; BROWNING, G.F. Bovine encephalitis herpesvirus is different from bovine herpesvirus 1 and from other ruminant herpesviruses. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p.149–150. 1985.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v.125, 584. 1989.
- SUGAMATA, M.; MIYAZAWA, M.; MORI, S.; SPANGRUDE, G.J.; EWALT, L.C.; LODMELL, D.L. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. **Journal of Virology**, 66: 1252-1260. 1992.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (semi-nested PCR) para detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24(1), p.43-56. 2003.
- TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinária Gaúcha**, 4 (1):61-65. 1998.
- 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, p.169-190, 2007.
- THOULOZE, M.I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. **Journal of Virology**, 72: 7181-7190. 1998.
- TIKOO, S.K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in virus research**, v.45, p.191-223, 1995.
- TORDO, N.; POCH, O. Structure of rabies virus. In: **Rabies**. Campbell J.B. & Charlton K.M. (Eds). Boston: Kluwer Academic Publishers, pp.25-45. 1988.
- TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: **Laboratory Techniques in Rabies**. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. (Eds). 4th ed. World Health Organization, pp.28-51. 1996.

TORRES, F.D.; CARGNELUTTI, J.F.; MASUDA, E.K.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 2 in a guinea pig model. **Microbial Pathogenesis**, 48 (2010) 69–73. 2010.

TURIN, L.; RUSSO, S.; POLI, G. BoHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread infection. **Molecular Medicine**, 5:261-284. 1999.

UBIALI, D.G.; CALDEIRA, F.H.B.; MORAES, L.G.; NETO, W.S.P.; ANTONIASSI, N.A.B.; ARRUDA, L.P.; SOUZA, M.A.; COLODEL, E.M. Causas de enfermidades com sinais clínicos nervosos em bovinos no Estado de Mato Grosso entre Janeiro de 2005 e Abril de 2008 diagnosticadas no LPV-UFMT. In: **Anais do Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário**. 2007.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in sêmen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Microbiology**, v.17(1): 29-33. 1995.

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

WAGNER, E.K. The homepage of Dr. Edward K. Wagner. The Herpes simplex virus research. HSV Replication. <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>
Acesso em: janeiro de 2011.

WANG, J.; HORNER, G.W.; O'KEEFE, J.S. Genetic characterisation of bovine herpesvirus 1 in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.54, n.2, p.61-66, 2006.

WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, 363: 959-969. 2004.

WEIBLEN, R.; BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, 25: 124, 666-667. 1989.

WINKLER, M. T. C.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology**, v.74, p.5337-5346, 2000.

WIRTH, U.V.; FRAEFEL, C.; VOGT, B.; VLCEK, C.; PACES, V.; SCHWYZER, M. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. **Journal of Virology**, v.66, p.2763-2772, 1992.

WUNNER, W.H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In Baer G. M.(Ed.). The Natural History of Rabies. **Boca Raton: CRC Press**, pp. 31-67. 1991.

WYLER, M.; ENGELS & SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1. In: G. Wytman and I. Becker, Editors. **Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs**. Developments in Veterinary Virology, Kluwer Academic Publishers, pp. 1–72. 1989.

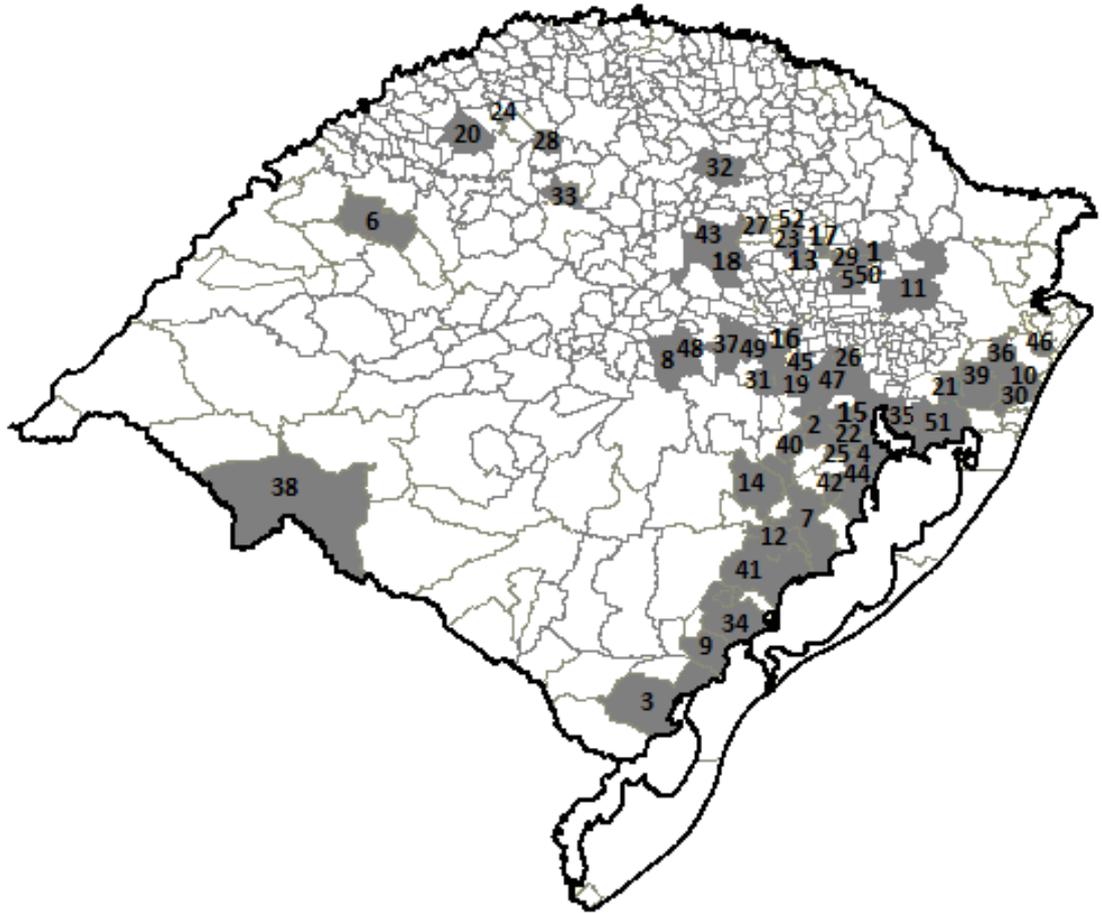
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Encephalitis, viral. Disponível em: http://www.who.int/topics/encephalitis_viral/en/ Acesso em: janeiro de 2011.

ZHENG, C.; BROWNLIE, R.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. **Virology**, v.324, p.327-339, 2004.

ANEXOS

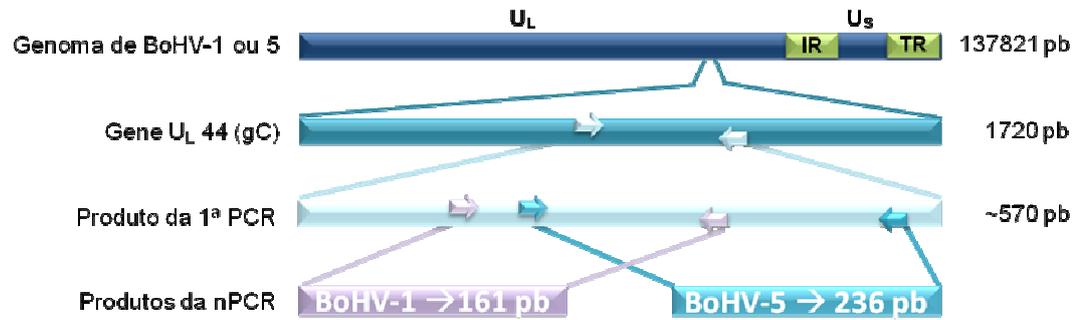
ANEXO 1

Mapa das cidades que enviaram amostras para diagnóstico de raiva



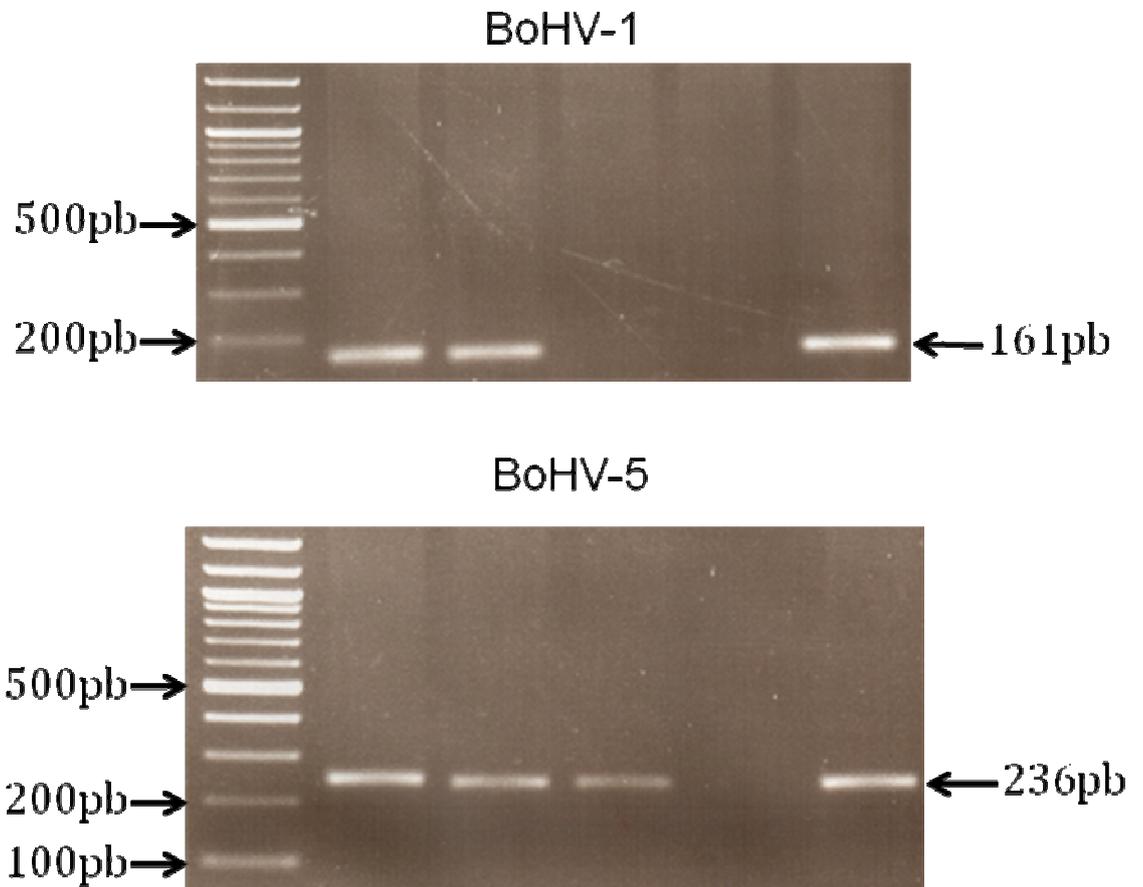
ANEXO 2

Representação das reações de amplificação da nested PCR para detecção de DNA de BoHV-1 e 5



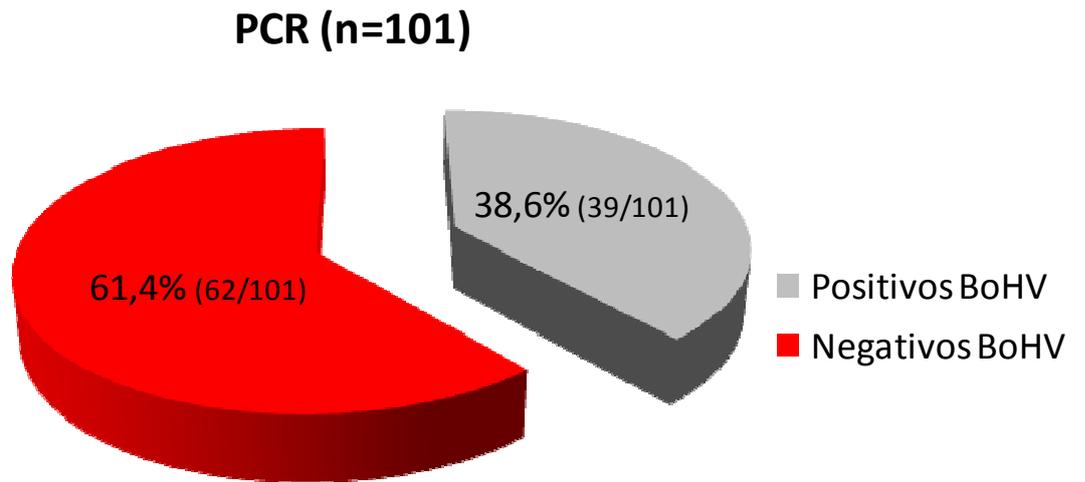
ANEXO 3

Foto em gel de agarose com os respectivos produtos de amplificação para BoHV-1 e BoHV-5



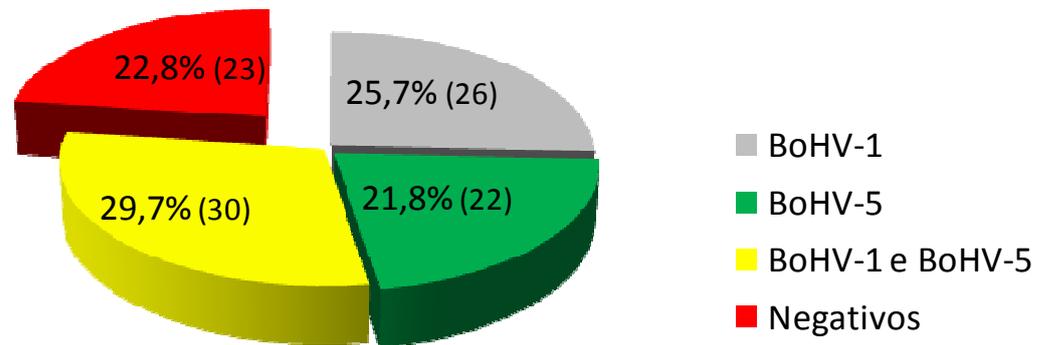
ANEXO 4

Gráfico dos resultados da PCR para BoHV



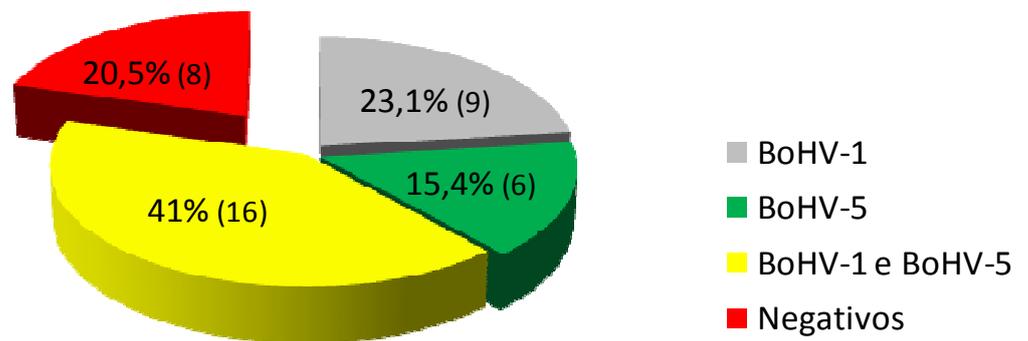
ANEXO 5

Gráfico do resultado da nested PCR

Nested PCR (n=101)

ANEXO 6

Gráfico do resultado da nested PCR nas amostras positivas para raiva

Nested PCR positivos para raiva (n=39)

ANEXO 7

Gráfico da nested PCR das amostras negativas para raiva

Nested PCR negativos para raiva (n=62)