



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

SALOMÉ GONÇALVES SIMÕES

**OCORRÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO 5 (BoHV-5) EM BOVINOS PROCEDENTES
DE MATADOUROS DO SERTÃO DO ARARIPE – PE.**

Recife

2015

SALOMÉ GONÇALVES SIMÕES

OCORRÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO 5 EM BOVINOS PROCEDENTES DE
MATADOUROS DO SERTÃO DO ARARIPE – PE.

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Alice da
Fonseca Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. José Wilton
Pinheiro Junior

Recife
2015

Ficha Catalográfica

S593o Simões, Salomé Gonçalves
Ocorrência do herpesvírus bovino 5 em bovinos procedentes
de matadouros do Sertão do Araripe - PE / Salomé Gonçalves
Simões. – Recife, 2015.
67f.: il.

Orientadora : Andréa Alice da Fonseca Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Medicina Veterinária, Recife, 2015.
Inclui referências e anexo(s).

1. Biologia molecular 2. Encefalite 3. Herpesvirose
4. Histopatologia 5. Ruminantes I. Oliveira, Andréa Alice da
Fonseca, orientadora II. Título

CDD 636.089

SALOMÉ GONÇALVES SIMÕES

OCORRÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO 5 EM BOVINOS PROCEDENTES DE
MATADOUROS DO SERTÃO DO ARARIPE – PE.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Aprovada em 11 de Setembro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréa Alice da Fonseca Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Sandra Regina Fonseca de Araújo Valença
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido esse título!

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Andrea Alice da Fonseca Oliveira, com carinho, paciência e competência aceitou a tarefa de me orientar num momento em que poucos acreditavam que esta dissertação viesse a ser concluída. A ela, devo essa dissertação em especial a atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também, ao coorientador Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior as indicações de preciosas leituras, incontáveis correções, mas, sobretudo, ao fato de ter sempre sido um incansável e atencioso mestre.

Aos grandes amigos Cícera M^a de Macedo Horas, Maryam Felix (Bodocó-PE), Michelle Ferreira (Ouricuri-PE), Antônio Jailson Sampaio Peixoto, Maurício Justino da Silva (Exu-PE) e João Gonçalves Simões por sempre me acompanhar durante as coletas, e todos os funcionários dos matadouros que sempre foram solícitos.

Prof.^a Dr.^a Márcia de Figueiredo Pereira e Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos por disponibilizar o Laboratório de Histopatologia – UFRPE para o processamento histopatológico das amostras, Prof. Dr. Valdomiro Amaro da Silva Júnior por realizar as leituras das lâminas.

Sueli Ferreira grande amiga, profissional competente! Por realizar a delicada atividade de microtomia, com sua ajuda foi uma atividade muito divertida.

A Coordenadora do Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/PE Dr.^a Diana Sione Barbosa Pinheiro e as Fiscais Federais Agropecuárias Dr.^a Adriana Soares Leite e Dr.^a Vânia Lúcia de Assis Santana por gentilmente ceder o Laboratório de Biologia Molecular para a realização de análise molecular das amostras.

Ao Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho por toda disponibilidade e por conceder a utilização da estrutura física do laboratório de Fisiologia Animal e Molecular Aplicada FAMA-UFRPE para que parte deste projeto fosse executada.

Ao grande amigo Diogo Manoel Farias da Silva que realizou todas as incontáveis corridas da PCR no FAMA e LANAGRO/PE, com sua serenidade e profissionalismo sempre me tranquilizou nos momentos de angústia. Muito Obrigada “Chefinho”, quem é generoso em doar obtém grandes colheitas!

Camila Pereira e Erika Samico amigas irmãs muito obrigada pelas sugestões e comentários durante o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE, representado pelo Prof. Dr. Anísio Francisco Soares e Prof.^a Dr.^a Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim pelos momentos compartilhados, sem esmorecimento e a todos os professores que fizeram parte desse caminhar.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

A grande glória da vida não está em nunca cair, mas em se levantar a cada vez que caímos.

(Nelson Mandela)

RESUMO

O conhecimento das enfermidades que acometem bovinos é de extrema importância, as doenças de manifestação neurológica são frequentes e causadas por vários agentes, o Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV – 5) é um vírus que provoca neuropatia em bovinos, latência no sistema nervoso central (SNC) e manifestação clínica em períodos de estresse. Objetivou-se com este estudo pesquisar a ocorrência da infecção pelo BoHV-5 em bovinos pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com base na utilização de dois protocolos e analisar os achados histopatológicos de amostras de sistema nervoso central de bovinos. Foram obtidas 48 amostras de SNC de bovinos, constituídas por encéfalo, cerebelo, tronco encefálico e medula, procedentes de três matadouros localizados nas cidades de Ouricuri, Bodocó e Exu, Sertão do Araripe, Pernambuco. Na análise molecular foram utilizados dois protocolos com diferentes *primers*. Com os iniciadores utilizados no protocolo 1 obteve-se 29,16% (14/48) das amostras positivas, no entanto, os iniciadores utilizados no protocolo 2, resultaram em picos bem definidos no controle positivo e todas as amostras resultaram negativas pela qPCR. Com base na análise histopatológica do SNC das amostras provenientes de bovinos do matadouro de Ouricuri-PE evidenciou-se as seguintes lesões: infiltrado linfocitário 90% (18/20), gliose 80% (16/20), neuronofagia 80% (16/20), edema 70% (14/20), macrófagos 65% (13/20), congestão 65% (13/20), desmielinização 45% (9/20), hemorragias 35% (7/20), necrose 15% (3/20), células gitter 5% (1/20), espongiose 5% (1/20) e manguito perivascular 5% (1/20). Em decorrência da diversidade de patógenos e similaridade das enfermidades neurológicas em bovinos, o uso de *primers* que apresentem poucas reações cruzadas (dímeros) é fundamental para a eficiência e o êxito do diagnóstico na qPCR frente ao BoHV-5.

Palavras-chave: Biologia molecular. Encefalite. Herpesvirose. Histopatologia. Ruminantes.

ABSTRACT

The knowledge of diseases that affect cattle is extremely important, the neurological manifestation of disease are frequent and caused by various agents , the Bovine herpesvirus type 5 (BoHV - 5) is a virus that causes neuropathy in cattle , latency in the central nervous system (SNC) and clinical manifestation in periods of stress. The object of the study was to research the DNA presence of Herpesvirus Type 5 in cattle through the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) based upon the utilization of two protocols and analyze the histopathological findings in samples of the cattle central nervous system. Forty-eight (48) cattle samples of the central nervous system samples were obtained comprised of brain, cerebellum, brain stem and spinal cord derived from three slaughterhouses located in the cities of Ouricuri, Bodocó and Exú, Araripe Wilderness in the state of Pernambuco. Under molecular analysis the efficiency of the protocols was compared using the following *primers*. With the primers used in protocol 1 there was obtained 29.16% (14/48) of the positive samples, however, the utilized primers in protocol 2 resulted in well defined peaks with regard to positivity of the positive controls and all of the samples were negative toward the qPCR. Based on histopathology analysis of central nervous system samples from Ouricuri-PE the following lesions became evident: lymphocytic infiltrate 90% (18/20), gliosis 80% (16/20), neuronophagia 80% (16/20), edema 70% (14/20), macrophages 65% (13/20), congestion 65% (13/20), demyelination 45% (9/20), bleeding 35% (7/20), necrosis 15% (3/20), gitter cell 5% (1/20), spongiosis 5% (1/20) and perivascular cuff 5% (1/20). As a result of the diversity of pathogens and similarity of neurological diseases in cattle the use of primers that present few crossed reactions (dimers) is fundamental for the efficiency and success of the qPCR against BoHV – 5.

Keywords: Molecular biology. Encephalitis. Herpes virus. Histopathology. Ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Região do Sertão do Araripe, estado de Pernambuco. Em destaque (círculos) os municípios estudados 39
- Figura 2.** Representação do teste de eficiência dos *primers* utilizados no protocolo 1 na qPCR-BoHV-5. 42
- Figura 3.** Representação do teste de eficiência dos *primers* utilizados no protocolo 2 na qPCR-BoHV-5. 43
- Figura 4** Curva de Dissociação qPCR – BoHV-5 protocolo 1. Observar o surgimento de vários picos inespecíficos “dímeros”. 44
- Figura 5** - Curva de Dissociação qPCR – BoHV-5 protocolo 2. Observar a presença de picos bem definidos. 44

Capítulo 1

Tabela 1 - Distribuição dos resultados por município estudado em relação à análise molecular por qPCR, com base em dois protocolos utilizados. 43

Tabela 2 - Achados histopatológicos e análise molecular das amostras de SNC de bovinos procedentes do município de Ouricuri-PE. 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM BOVINOS	14
2.2 HERPESVÍRUS BOVINO – 5	14
2.3 NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS	15
2.4 EPIDEMIOLOGIA	16
2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	17
2.6 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	19
2.7 DIAGNÓSTICO	20
2.8 CONTROLE E PREVENÇÃO	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 REFERÊNCIAS	24
5 CAPÍTULO 1 - Ocorrência do Herpesvírus Bovino 5 em Bovinos Procedentes de Matadouros no estado de Pernambuco, Brasil.	35
ANEXO A – Normas para submissão ao periódico <i>Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.</i>	52

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma atividade de grande importância econômica no Brasil, ocupando a segunda posição no *ranking* mundial, sendo antecedido pela Índia (USDA, 2010). Em 2011, a criação de bovinos apresentou um aumento de 1,6% em relação a 2010 (209,5 milhões), totalizando um efetivo de aproximadamente 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2011). A região Nordeste, por sua vez, registrou uma queda no seu efetivo totalizando 28.244 milhões de cabeças em 2012, fato justificado pela seca prolongada que resultou na perda de inúmeros plantéis, sendo Pernambuco o principal estado atingido (IBGE, 2013).

Somando-se as perdas ocorridas pelas intempéries climáticas, as enfermidades de ordem geral determinam prejuízos. Neste contexto destacam-se nos bovinos os distúrbios de ordem neurológica que abrangem um grupo de enfermidades consideradas de importância, quer seja pelos aspectos que envolvem a saúde pública ou pelas expressivas perdas econômicas que ocasionam. Em decorrência de sinais clínicos semelhantes, são aspectos importantes para o diagnóstico das neuropatias: a frequência da doença e o estudo epidemiológico (AQUINO NETO et al., 2009).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) durante a década de 80 elaborou dois programas direcionados a vigilância e notificação das neuropatias em bovinos no Brasil, essas ações ocorreram em virtude do surgimento da encefalite espongiforme bovina na Europa, nesse período o MAPA criou Programa de Vigilância das Encefalopatias Espongiformes em Ruminantes, o Programa Nacional de Controle de Raiva em Herbívoros e em decorrência da Raiva ser a principal neuropatia notificada no Brasil (WELLS et al., 1987, SANCHES et al., 2000; BARROS et al., 2003; BARROS et al., 2006). No Brasil as principais enfermidades notificadas que afetam o SNC de bovinos são a raiva, e a meningoencefalite por herpesvírus bovino -5 (BoHV-5) e a febre catarral maligna (FCM).

Os herpesvírus são heterogêneos, não diferenciados morfológicamente pela microscopia eletrônica e podem replicar-se em diferentes tecidos como o nervoso, glandular, linfóide e órgãos parenquimatosos (STRAUB, 1982). Os herpesvírus possuem uma alta especificidade com seus hospedeiros, o que indica que o vírus possa ter evoluído juntamente com seus hospedeiros (THIRY et al., 2007). Para explicar o surgimento e a adaptação do BoHV- 5 à espécie bovina foram formuladas várias

hipóteses, o BoHV-5 poderia ser um herpesvírus natural de espécies de ruminantes relacionadas que teria se adaptado aos bovinos. Nestes animais, por uma falha em fases finais do ciclo de replicação viral, por ocasião do estabelecimento de latência no gânglio trigêmeo, o vírus provocaria uma encefalite fatal. Outras hipóteses são que o BoHV-5 poderia ser um vírus recombinante entre o BoHV-1 e outro herpesvírus relacionado de ruminantes ou então um rearranjo genômico do BoHV-1 (STUDDERT, 1989).

A similaridade de sinais com outras doenças infecciosas e parasitárias, não permite a elaboração de um diagnóstico clínico conclusivo da infecção ocasionada pelo BoHV – 5 (TAKIUCHI et al., 2001). A complementação diagnóstica por meio da associação de técnicas de caracterização etiológica com a observação de alterações morfológicas, e avaliação epidemiológica da ocorrência de doenças neurológicas da região são fundamentais para o êxito no diagnóstico (ARRUDA et al., 2010).

A família *Herpesviridae* possui a característica de estabelecer latência em células ganglionares do animal infectado, nesse momento, podem ocorrer episódios de reativação e excreção viral não acompanhada de sinais clínicos, por meio de pontes intercelulares o vírus pode migrar de uma célula à outra sem entrar em contato com o espaço extracelular e com os líquidos corporais, ficando indisponíveis para a atuação de anticorpos. (STRAUB, 1982).

Durante a latência não é possível o isolamento do vírus e a imunohistoquímica para a demonstração de antígenos virais na célula infectada. Entretanto, a utilização de técnicas moleculares é capaz de detectar o DNA viral e identificar os sítios de latência. Em contraste com a infecção ativa, onde a replicação viral seguida de lise celular ocorre principalmente em tecidos periféricos, a infecção latente geralmente não determina a lise da célula infectada e ocorre em células de vida longa, com baixa taxa de replicação e altamente diferenciadas, como os neurônios e células linfoides (ASHBAUGH et al., 1997; CARON et al., 2002).

Tendo em vista a escassez de informações sobre a ocorrência da infecção pelo BoHV-5 no Estado de Pernambuco, especificamente na Região do Sertão do Araripe, faz-se necessário conhecer a ocorrência do agente e assim possibilitar a adoção de medidas sanitárias de controle e prevenção adequadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM BOVINOS

Diversos agentes, priônicos, virais, bacterianos, parasitários, e não infecciosos podem provocar encefalites, que são lesões inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC). Alguns dos agentes são zoonoses, por isso impactam diretamente a saúde pública como o vírus da raiva, o príon agente causador da encefalopatia espongiforme bovina (EEB), a *Listeria monocytogenes*, outros infectam apenas animais como os vírus da família *Herpesviridae*, a leucose enzoótica bovina, e o vírus da diarreia viral bovina. Esta diversidade de agentes implica em esforços por parte do Sistema de Defesa Sanitária Animal para realizar o diagnóstico diferencial e confirmação do agente para aplicar as medidas específicas de controle (CLAUS et al., 2002; BARROS et al., 2006).

O diagnóstico *ante mortem* é de difícil realização devido à ausência de sinais clínicos patognomônicos. Por este motivo, o diagnóstico *post mortem* com auxílio de métodos laboratoriais é indispensável (HALFEN e VIDOR, 2001).

2.2 HERPESVÍRUS BOVINO – 5

As infecções por Herpesvírus bovino têm acarretado grandes prejuízos econômicos nos rebanhos bovinos, queda na produção leiteira, morte embrionária e fetal, reduzida eficiência reprodutiva de fêmeas e machos, bem como restrições ao comércio internacional de animais e de seus subprodutos, descritos no Código de Sanitário para Animais Terrestres (OIE, 2010).

O Herpesvírus bovino – 5 (BoHV-5) provoca uma doença infecciosa viral aguda e altamente fatal em animais, a ocorrência é mundial, caracterizada por sinais neurológicos corticais e associada à inflamação do encéfalo e meninges com necrose do córtex telencefálico (RISSI et al., 2006). Os bovinos são considerados os hospedeiros naturais dos BoHV-5; casos espontâneos da enfermidade têm sido descritos apenas nessa espécie, mas a doença já foi reproduzida experimentalmente em ovinos e coelhos (SILVA et al., 1998; FLORES et al., 2009; CADORE et al., 2011; PEDRAZA-ORDÓÑEZ et al., 2012).

A meningoencefalite herpética dos bovinos pode ser confundida clinicamente com doenças como a raiva, pseudorraiva, polioencefalomalácia por deficiência de tiamina, intoxicação por chumbo e intoxicação por sal (SANCHES et al., 2000; LEMOS et al., 2002; SPILKI et al., 2003).

2.3 NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS

A palavra herpes deriva do grego ερπειν (herpein), que significa rastejar, referindo-se à característica da lesão determinada pelos herpesvírus humanos, como o Herpes simplex vírus (HSV) e Varicella zoster vírus (VZV). Os vírions da família *Herpesviridae* contem envelope composto por uma membrana lipídica e glicoproteínas um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100-110 nm de diâmetro, constituído por 12 capsômeros pentaméricos e 150 hexaméricos (KNOWLES, 2011). O DNA e o capsídeo são envoltos por um material amorfo denominado tegumento e externamente por um envelope lipoprotéico, no qual se encontram inseridas várias glicoproteínas virais que formam projeções (ROIZMAN et al., 2001). O genoma do BoHV-5 possui 137.821 pares de base (137,8 kpb), sendo composto por 75% de guanina/citosina (DELHON et al., 2003)

O BoHV-5 pertence à ordem *Herpesvirales*, a qual se constitui por três famílias de herpesvírus denominadas *Alloherpesviridae*, *Herpesviridae* e *Malacoherpesviridae*. A família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias denominadas *Alpha*, *Beta* e *Gammaherpesvirinae*. A *Alphaherpesvirinae* contém quatro gêneros: *Simplexvirus*, *Varicelovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*. Dentro do gênero *Varicelovirus*, há dezessete espécies que acometem variados hospedeiros. Entre essas dezessete espécies, encontram-se o BoHV_5 (ICTV, 2009). Os genes dos Alphaherpesvirus são expressos pelo mecanismo de cascata. Assim, no instante em que o genoma viral se liberta do capsídeo inicia-se a produção de proteínas precoces imediatas, que promovem a produção de proteínas imediatas; por fim há produção de proteínas tardias seguindo a síntese do DNA viral (SALVADOR et al., 1998).

Devido às semelhanças com estirpes virais respiratórias e genitais, inicialmente o BoHV-5 foi classificado como BoHV-1.3, com base em diferenças epidemiológicas, antigênicas e moleculares, o subtipo 3, foi reconhecido como um vírus distinto,

denominado BoHV-5 e passou a compor uma nova espécie da família *Herpesviridae* (ROIZMAN et al., 1992). O tipo 5 encontra-se dividido nos subtipos: BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5c (D'ARCE et al., 2002, HOLZ, 2010). Entretanto, não existe informação a respeito de associações entre distintos subtipos de BoHV-5 e diferentes quadros clínicos. A única associação clara e reconhecida é a correlação entre casos de encefalite e meningoencefalites agudas e o isolamento de BoHV-5 a partir de tecido nervoso de animais afetados (CARRILO et al., 1983; WEIBLEN et al., 1989; D'OFFAY et al., 1995; COLODEL et al., 2002). A maior diferença entre o BoHV-1 e o BoHV-5 está na capacidade do BoHV-5 invadir e replicar-se no SNC, determinando enfermidade neurológica (BAGUST, 1972; STUDDERT, 1989; ROIZMAN et al., 1992; BELKNAP et al., 1994).

Análises com anticorpos monoclonais (MAbs) têm demonstrado diferenças antigênicas entre as principais glicoproteínas (gB, gC e gD) do BoHV-5 e do BoHV-1. A sequência de aminoácidos do segmento amino-terminal da gC desses dois vírus apresenta diferenças significativas (COLLINS et al., 1993; CHOWDHURY, 1995; ROEHE et al., 1997). Os estudos conduzidos com o objetivo de elucidar as bases genômica e antigênica da neurovirulência do BoHV-5 têm-se concentrado nas glicoproteínas virais que apresentam as maiores diferenças quando comparadas às presentes em estirpes do BoHV-1. Assim, glicoproteínas como a gC, gE e gI têm sido relacionadas com o potencial neuropatogênico do BoHV-5 (CHOWDHURY et al., 2000a, 2000b).

Com relação à composição genômica, o DNA do BoHV-5 apresenta similaridade de 85% com o BoHV-1. Sugere-se que as diferenças na sequência de nucleotídeos entre esses dois vírus estejam distribuídas por todo o genoma (ENGLES et al., 1987; CHOWDHURY, 1995).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

A transmissão é geralmente associada ao contato íntimo com essas superfícies, mas o BoHV-5 é também propagado por aerossóis e secreções corpóreas (FENNER et al., 1993). Foi comprovado que o vírus é eliminado via sêmen, em animais assintomáticos (ESTEVEZ et al., 2003; GOMES et al., 2003; SILVA et al., 2007).

Apresentando baixos índices de morbidade, mas elevados índices de letalidade (SALVADOR et al., 1998), a doença ocorre na forma de surtos ou em casos isolados, com coeficientes de morbidade que podem variar de 0,05% - 5%, a letalidade é quase sempre 100% (RISSI et al., 2007).

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

Surtos de encefalite herpética têm sido relatados em vários países, onde o primeiro surto notificado, ocorreu na Austrália em bezerros de dois a seis meses de idade (JOHNSTON et al., 1962), seguido pela Hungria (BARTHA et al., 1969), Estados Unidos (EUGSTER et al., 1974; D'OFFAY et al., 1995; ELY et al., 1996), Canadá (BECK, 1975), Escócia (WATT et al., 1981), Uruguai (DIAS et al., 1982), Argentina (CARRILLO et al., 1983; VALERA et al., 2000; PEREZ et al., 2003) e Colômbia (PEDRAZA et al., 2010).

No Brasil, já foram descritos surtos em alguns estados das regiões Centro-oeste (DE PAULA et al., 2005), Sudeste (SALVADOR et al., 1998; GOMES et al., 2002; AQUINO NETO, 2005) e Norte (RIET-CORREA et al., 2006). Estudo realizado no semiárido nordestino determinou o BoHV-5 como responsável por 2,7% (3/111) dos casos de doença neurológica em bovinos (GALIZA et al., 2010), enquanto Sanches et al. (2000), na região Sul encontraram em 305 casos 4,59% positivos para BoHV-5. Fonseca Jr. et al. (2011), por meio da PCR Multiplex detectaram cerca de 20% (10/65) em amostras de encéfalo provenientes de várias regiões do estado de Minas Gerais.

Mudanças ambientais podem também atuar em conjunto sobre o sistema imunológico, predispondo os animais a outros patógenos, e a reativação de infecções latentes. O estresse, má nutrição, aglomeração, mudança de alimentação, transporte, tem sido frequentemente responsabilizada por surtos de doenças associadas ao BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos (FLORES e CARGNELUTTI, 2012).

2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

São três as características básicas da infecção pelos herpesvírus: epiteliotropismo, lise celular e capacidade de latência. As principais portas de entrada do vírus são as superfícies mucosas do trato respiratório e genital, (MEYER et al., 2001; GOMES et al., 2003; VOGEL et al., 2004). A maioria dos herpesvírus, provavelmente, reconhece múltiplos receptores celulares, qualquer um dos quais pode ser suficiente para a entrada na célula (SPEAR e LONGNECKER, 2003). A partir de então, ocorrem as seguintes fases: 1) adsorção; 2) penetração; 3) transporte do nucleocapsídeo e proteínas virais contidas no tegumento ao núcleo das células infectadas; 4) transcrição, replicação e síntese do DNA e proteínas virais; 5) montagem e preenchimento dos capsídeos e 6) liberação da progênie infecciosa. Presume-se que ocorra de forma semelhante para o BoHV-1 e 5 (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

A primeira via de infecção é a olfatória, após inoculação intranasal, os alvos iniciais de replicação dos *Alphaherpesvirus* são as células superficiais da mucosa respiratória, essa fase pode persistir por mais de 15 dias (VOGEL et al., 2004). Após replicação na mucosa nasofaríngea, os vírions invadem as terminações dos neurônios bipolares que inervam a mucosa e distribuem-se na mucosa, o vírus é provavelmente transportado na forma de partícula subviral (capsídeo desprovido de envelope) em vesículas envolvidas com o transporte axônico retrógrado aos corpos neuronais de neurônios sensoriais e autonômicos, na mucosa do trato respiratório superior produzindo sinais respiratórios leves a moderados (FLORES et al., 1998; MEYER et al., 2001; VOGEL et al., 2004).

A segunda pela via trigeminal, pelos axônios dos neurônios pseudounipolares, cujos corpos celulares localizam-se no gânglio trigêmeo e projetam terminações aos núcleos sensoriais da ponte e do bulbo (NARITA et al., 1976, CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; MEYER et al., 2001, PEREZ et al., 2002). A invasão e replicação viral no SNC resultam em meningoencefalite não supurativa (BAGUST, 1972; NARITA et al., 1976; BELTRÃO et al., 2000; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002).

Nos corpos neuronais, o vírus pode replicar-se ativamente ou estabelecer infecção latente. Ácidos nucléicos e proteínas virais são facilmente demonstráveis nos

gânglios sensoriais, o vírus persiste dentro dos neurônios provavelmente por toda a vida do hospedeiro, sob a forma de uma molécula circular fechada, e onde somente uma pequena porção do gene viral é expressa, e exames ultraestruturais revelam replicação viral ativa. Replicação significativa no sistema nervoso periférico após a infecção aguda ou reativação da latência pode resultar em invasão do sistema nervoso central, provocando alterações que variam desde infecção subclínica até encefalite fatal (FLORES et al., 1998).

Os genes e as proteínas codificadas envolvidos na neurovirulência de *Alphaherpesvirus* são classificados em três grupos: as enzimas envolvidas no metabolismo de ácido nucleico, os fatores que modulam a resposta imunitária e as glicoproteínas virais. As glicoproteínas virais desempenham importante papel na virulência, mediando adsorção e a penetração do vírion na célula hospedeira, além da disseminação célula a célula e a indução de resposta imune do hospedeiro, como ligações às imunoglobulinas e componentes do sistema imune (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010; ROLLOF, 2014).

As glicoproteínas B (gB), C (gC) e D (gD) são imunodominantes e estão presentes em maior concentração, sendo importantes para o início do processo de infecção viral, e contribuem com a adsorção viral ligando-se a receptores celulares da membrana celular (ROLLOF, 2014). Já as glicoproteínas E (gE) e G (gG) estão envolvidas na transmissão do vírus célula a célula, sendo a gG necessária para manter a adesão entre as células infectadas (NAKAMICHI et al., 2002). A gG tem a particularidade de ser útil na diferenciação do BoHV-1 e 5, uma vez que a região codificadora apresenta na sua porção final uma deleção no genoma do BoHV-1, em comparação com o BoHV-5, além de pequenas trocas e inserções ao longo do gene (OLIVEIRA, 2006).

A doença apresenta curso clínico de 1 a 15 dias, inicialmente os sinais clínicos associados com a infecção do BoHV – 5 são febre, depressão profunda, corrimento nasal, ocular e disfagia (CARRILLO et al., 1983). Os sinais neurológicos geralmente se iniciam no 9º ou 10º dia pós-infecção e incluem tremores, bruxismo, salivação, protusão da língua, opistótono, cegueira, andar em círculos, prostração seguida de convulsões, pressão da cabeça contra anteparos, hiperexcitabilidade, decúbito e morte (BAGUST,

1972; NARITA et al., 1976; BELTRÃO et al., 2000; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002).

Os sinais neurológicos são progressivos e geralmente resultam em morte, embora casos de recuperação após curso clínico de intensidade leve ou moderada também possam ocorrer (BELKNAP et al., 1994; BELTRÃO et al., 2000) Pode ainda estabelecer latência sem produzir sinais clínicos de meningoencefalite durante a infecção primária (MEYER et al., 2001).

2.6 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

O vírus e alterações histopatológicas podem ser detectados em várias áreas do encéfalo de animais que morrem ou são sacrificados durante o curso da enfermidade neurológica (BELTRÃO et al., 2000; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002).

Histopatologicamente a doença é caracterizada pela presença de meningoencefalite não supurativa com necrose em córtex cerebral (COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004). A localização e intensidade das lesões são variáveis podendo apresentar áreas de malácia. Em alterações recentes são observados necrose neuronal aguda, com presença de neurônios com núcleos picnóticos e citoplasma acidofílico e retraído (neurônios vermelhos), edema, tumefação do endotélio vascular, infiltrado inflamatório mononuclear ou misto, nos espaços de Virchow Robin (mangitos perivascularares) e infiltração difusa do neurópilo (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RISSI et al., 2006). Gliose difusa ou focal, neuronofagia e áreas focalmente extensas de necrose do componente neuroectodérmico, preenchidos por macrófagos volumosos de citoplasma espumoso (células Gitter) e manutenção das estruturas mesenquimais (vasos e células da glia), características de malácia (COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RISSI et al., 2006).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das encefalites virais de bovinos pode ser obtido associando-se dados epidemiológicos, sinais clínicos e resultados de exames laboratoriais *ante-mortem* e *post-mortem* (COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004, RISSI et al., 2006).

Nas doenças herpéticas durante a infecção aguda e reativação da latência há excreção viral em secreções nasais e genitais. Entretanto, a massa viral e o tempo em que é eliminada são maiores na infecção genital quando comparados a nasal (VOGEL et al., 2003). A detecção por meio de métodos diretos inclui o isolamento viral, hibridização *in situ* e imunohistoquímica (D'OFFAY et al., 1995; ELY et al., 1996).

O diagnóstico da infecção pelo BoHV-5 pode ser realizado por métodos indiretos como: vírus neutralização, imunofluorescência, imunoperoxidase, porém como o BoHV-1 e o BoHV-5 apresentam similaridades em suas sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA), isto dificulta a distinção correta entre estas duas estirpes virais, pois podem ocorrer reações cruzadas (MEYER et al., 2001). A sorologia tem valor limitado no diagnóstico indireto, uma vez que os métodos rotineiros disponíveis para a detecção de anticorpos não diferenciam animais infectados pelo BoHV-5 daqueles infectados pelo BoHV-1 (WELLENBERG et al., 2001).

Em estudo realizado para a tentativa de avaliação sorológica discriminativa entre animais infectados com o BoHV-1 e o BoHV-5, testes de soroneutralização foram empregados frente a estirpes de ambos os tipos virais e os títulos obtidos foram comparados. Os resultados demonstraram, além da reatividade sorológica entre esses vírus, uma proporção de animais suspeitos de infecções pelo BoHV-1 que foram positivos para BoHV-5 (ANZILIERO et al., 2011).

Para o diagnóstico do BoHV-1, a PCR em tempo real é comumente recomendada pela OIE (2010). A utilização da PCR na identificação do agente viral em material genético de amostras clínicas é o meio mais preciso, a técnica apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada às tradicionais técnicas de isolamento viral, imunofluorescência e hibridização para o diagnóstico dos herpesvírus bovinos (CAMPOS et al., 2009). Em virtude do aparecimento de reações cruzadas originadas da alta homologia genômica e antigênica entre o BoHV-1 e BoHV-5, o diagnóstico molecular é uma ferramenta importante na diferenciação dos dois agentes (ESTEVES et al., 2007).

O uso da análise molecular é apropriado para detectar o BoHV-5 e diferenciá-lo do BoHV-1, em amostras de campo ou procedentes de experimentos laboratoriais (ALEGRE et al., 2001; GOMES et al., 2003), além de permitir a detecção de DNA viral em período de latência e a identificação desses sítios (SILVA et al., 1998). Ensaio

moleculares com uso de enzimas de restrição propiciaram a caracterização de amostras de BoHV-5 em subtipos BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5na/nb (D'ARCE et al., 2002; OLIVEIRA, 2006).

Vários tipos de PCR vêm sendo desenvolvidas para o aprimoramento do diagnóstico dos herpesvírus em bovinos, tais como: PCR convencional, nested-PCR, multiplex-PCR e PCR Real Time (qPCR). Esteves et al. (2007) e Arruda et al. (2010), empregaram a PCR convencional em amostras parafinadas para realizar o estudo retrospectivo em bovinos com doenças neurológicas, que foram anteriormente inconclusivas frente a outros métodos de diagnóstico.

Apesar da existência de diversos trabalhos na literatura utilizando a PCR, ainda são poucos os relatos do diagnóstico de BoHV-1 e 5 por qPCR, trabalhos recentes demonstram a detecção do BoHV-5 com sistema SYBR *Green* em embriões bovinos (CARDOSO et al., 2013) e em amostras parafinadas de cérebro bovino (PEDRAZA-ORDOÑEZ et al., 2013).

Pedraza-Ordoñez et al. (2013), estudaram amostras emblocadas em parafina, comparando os iniciadores utilizados por Gomes et al. (2002) e Campos et al. (2009), conseguiram reduzir as reações cruzadas e aumentar a eficiência da qPCR para o diagnóstico do BoHV-5, além de concluírem que a técnica é uma ferramenta útil no diagnóstico da infecção por herpesvírus em bovinos, mesmo em amostras armazenadas em formalina ácida por longos períodos.

2.8 CONTROLE E PREVENÇÃO

O controle da infecção pelo herpesvírus, como o BoHV-1, fundamenta-se principalmente na imunização com vacinas inativadas ou com vacinas vivas modificadas. Na indisponibilidade, até o momento, de um imunógeno contendo especificamente o BoHV-5, as vacinas preparadas com o BoHV-1 podem ser utilizadas, de uma forma emergencial, para a tentativa de controle de focos de meningoencefalite herpética, pois ocorre proteção cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5 (STRAUB, 1991; FENNER et al., 1993).

As medidas de controle do BoHV-5 em um rebanho estão relacionadas com a severidade da infecção, práticas de manejo e com índices de prevalência. Programas de

vacinação são recomendados para sistemas de recria e confinamento que agregam bovinos de várias procedências e em regiões que apresentem alto índice da infecção no rebanho com comprovação laboratorial da doença. O exame prévio de reprodutores antes da introdução do animal no rebanho, o descarte de animais positivos, são medidas de biossegurança para evitar a introdução e disseminação da doença nos rebanhos sem histórico da enfermidade (FLORES e CARGNELUTTI, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a ocorrência da infecção pelo Herpesvírus Bovino 5 em sistema nervoso central de bovinos procedentes de matadouros localizados no Sertão do Araripe - Pernambuco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de DNA do BoHV-5 pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR);
- Comparar dois protocolos sugeridos pela literatura para detecção de DNA do BoHV-5 pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).
- Identificar e avaliar alterações microscópicas pela análise histopatológica convencional em amostras de sistema nervoso central de bovinos procedentes do município de Ouricuri-PE.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANZILIERO, D.; SANTOS, C.M.B.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, T.; CHOWDRURY, S.I.; FLORES, E.F. (2011) A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. *Vet Microbiol*, 154:14-22.

AQUINO NETO, H. M. Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5 - relato de caso. 2005, 30f. Monografia (Especialização em Residência Médico-Veterinária nível 1) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AQUINO NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LOBATO, Z.I.P.; ALVARENGA, M.R.; SERRANO, A.L.; MARTINS, R.A.; AFONSO, D.A.F. (2009) Meningoencefalite por Herpesvirus Bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 61(1):1-5.

ARRUDA, L.P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; CRUZ, R.A.S.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M. (2010) Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica. *Pesq Vet Bras*, 30:646-650.

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 Diag Invest*, 9:387-394.

BAGUST, T.J. (1972) Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Path*, 82:365-374.

BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. (2003). Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos. MAPA/DAS/DDA, Brasília.

BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. (2006) Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil. Agnes, São Paulo, 166-171.

BARTHA, A.; HAIDU, G.; ALDASSY, P.; PACZOLAY, G. (1969) Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 19:145–151.

BECK, B.E. (1975) Infectious bovine rhinotracheitis encephalomyelitis in cattle and its differential diagnosis. *Can Vet J*, 16:269-271.

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: 358–365.

BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.; ROEHE, P.M. & IRIGOYEN, L.F. (2000) Infecção e enfermidade neurológica por Herpesvirus bovino 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesq Vet Bras*, 20:144-150.

CADORE, G.C.; ANZILIERO, D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. (2011). Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente. *Pesq Vet Bras*, 31:1090-1096.

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*, 139:67–73.

CARDOSO, T.C.; SILVA-FRADE, C.; TÁPARO, C.V.; OKAMURA, L.H.; FLORES, E.F. (2013) Validation of a reference control for an SYBR-Green fluorescence assay-

based real-time PCR for detection of bovine herpesvirus 5 in experimentally exposed bovine embryos. *Mol Cell Probes*, 27(5-6):237-242.

CARON L., FLORES E.F., WEIBLEN R., SCHERER C.F., IRIGOYEN L.F., ROEHE P.M., ODEON A. & SUR J.H. (2002) Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet Microbiol*, 84:285-295.

CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. (1983) Pathology of a bovine virus necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentbl. Vet Med B*, 30:161-168.

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*, 213:558-568.

CHOWDHURY, S. I.; LEE, B. J.; MOSIER, D.; SUR, J. H.; OSORIO, F. A.;KENNEDY, G.; WEISS, M. L. (1997) Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol*, 117:295-310.

CHOWDHURY, S. I.; LEE, B.J.; OZKUL, A.; WEISS, M.L.(2000a) Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J Virol*, 74: 2094-2106.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; ONDERCI, M.; WEISS, M.L.; MOSIER,D. (2000b) Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J Neurovirol*, 6:284–295.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. (2002) Herpesvírus Bovino tipo 5 e Meningoencefalite herpética bovina. *Semina*, 23(1):31-141.

COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; WHESTONE, C.A.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. (1993) Antigenic differences between the mayor glycoprotein ok bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. *J Gen. Virol*, 74:1509-1517.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA,R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O. & CARON, L. (2002) Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciênc Rural*, 32:293-298.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. (2002) Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol*, 88:315–324.

De PAULA, R.R.; SOUZA, M.A.; COLODEL E.M.; HÜBNER S.O.; BRUM K.B.; JORGE K.B.C.; DAMASCENO A.D. (2005) Meningomieloencefalite causada pelo BHV-5 em bovino no Estado de Goiás. In: XII ENAPAVE, 2005, Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec*, Belo Horizonte, MG: FEP MVZ Editora, 57:2.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. (2010) Biology of Bovine Herpesvirus 5. *Vet J*, 184:138-145.

DELHON,G.; MORAES,M.O., LU,Z.; AFONSO,C.L.; FLORES,E.F.; WEIBLEN.R.; KUTISH,G.F.; ROCK, D. L. (2003) Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol*, Washington.77(19):10339-10347.

DIAS, L.E.; MAISONNAVE, J.; GUARINO,H. (1982) Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) descripción de caso clínico em terneros de tambo. In:CONGRESSO NACIONAL DE VETERINARIA, Montevideo, Uruguay. *Anais*. Montevideo: Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, 521-530.

D'OFFAY, J.M.; ELY, R.W.; BALDWIN, C.A.; WHITENACK, D.L.; STAIR, E.L.; COLLINS, J.K. (1995) Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J Vet Diag Invest*, 7:247- 251.

ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. (2004). Meningoencefalite encefalomalácia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq Vet Bras*, 24:123-131.

ELY, R.W.; D'OFFAY, J.M.; RUEFER, A.H.; CASH, C.Y. (1996). Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J Vet Diagn Invest*, 8:487-492.

ENGLES, M.; STECK, F.; WYLER, R. (1987). Comparison of the genomes of infectious bovine. The genome of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BoHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res*, 6:57-73.

ESTEVEES, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C. (2003). Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec*, 152: 658-659.

ESTEVEES, 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.; RIKSEWIJK, F.A.; BATISTA, H.B.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. (2007). Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (AS). *Virus Res*, 131(1):16-22.

EUGSTER, A.K.; ANGULO, A.B.; JONES, L.P. (1974). Herpesvirus encephalitis in range calves. *Proceedings Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnostic.*, 17:267-290.

FENNER, F.L.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A. (1993). *Veterinary virology*, San Diego: Academic, 2:676.

FLORES, E.; SILVA, A.; WEIBLEN, R. (1998) Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5) (avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais. In: *Simpósio Internacional de Herpesvirus Bovino e Vírus da Diarreia Viral Bovina*. Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, 127-137.

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

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

FONSECA JR., A.A.; COSTA, E.A.; OLIVEIRA, T.S.; SALES, E.B.; SALES, M.L.; LEITE, R.C.; HENEIMANN, M. B.; REIS, J.K.P. (2011). PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 63:1405-1413.

GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M. (2010) Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq Vet Bras*, 30(3):267-276.

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. (2002) Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 54:217-220.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. (2003) Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the Us4 gene. *Vet Res Communic*, 27:495–504.

HALFEN, D.C.; VIDOR, T. (2001) Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5 In: Riet-Correa F.; Schild A,L.; Méndez M,C. & Lemos R,A,A. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equinos*. São Paulo: Varela, 1(2):426.

HOLZ, C.L; CIBULSKI,A.P; TEIXEIRA,T.F; BATISTA,H.B.C.R; CAMPOS, F. R; SILVA,J.R; VARELA, A. P.M; CENCIA; BRANCO,A.C; ROEHE, P.M; 2010. In. Press. Prevalência de herpesvírus bovinos tipo 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*, 31:22-24.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Estatística da produção agropecuária. Censo agropecuário. Produção Pecuária Municipal (PPM). 2011. Acesso em fevereiro 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Estatística da produção agropecuária. set . 2013. Disponível em : http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf. Acesso em 25 de maio de 2015.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em 2009 <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp?version>. Acesso em 16 de setembro de 2015.

JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C. & MCGAVIN, M.D. (1962) Viral meningoencephalitis in calves. Aust Vet J, 38:207-215.

KNOWLES, D. (2011) Herpesvirales: In: Fenner's Veterinary Virology Academic Press China, 4:179-201.

LEE, B. J.; WEISS, M. L.; MOSIER, D.; CHOWDHURURY, S. I. (1999) Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. J Neurovirol, 5:474-484.

LEMOS, R.A.A.; BARROS, N.; BRUM, K.B. (2002) Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte, perguntas e respostas. Campo Grande: Editora Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 292.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; 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.

NAKAMICHI, K., Y. MATSUMOTO, OTSUKA, H. (2002) Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary to maintain cell-to-cell junctional adherence among infected cells. Virology, 294:22–30.

NARITA, M; INUI. S; NAMBA. K; SHIMIZU. Y. (1976) Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Comp Path*, 86:93-100.

OIE. World Organization for Animal Health, 2010. Terrestrial Animal Health Code. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.4.13, p.1-17. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf. Acesso em: 20 de janeiro de 2015.

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

PEDRAZA, F.J.; ALESSI, A.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. (2010). Detection of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by nested PCR in Colombian cattle. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 23:292-298.

PEDRAZA-ORDÓÑEZ, F.J. Resposta celular no encéfalo de coelhos experimentalmente inoculados com herpesvírus bovino 5 (BoHV-5). 2012, 59p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal.

PEDRAZA-ORDOÑEZ, F.; YAMATOGLI, R.S.; ARAUJO JR, J.P.; ROCHA, N.S.; ALESSI, A.C. (2013). The use of real time PCR (qPCR) for the diagnosis of bovine herpesvirus 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain samples identified as bovine unspecific encephalitis. *J Vet Sci Technol*, 4: 5.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F.; ODEON, A.C. (2002) Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in bovine nervous system. *Vet Path*, 39:437-444.

PEREZ, S.E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J.H.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C. (2003) Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvírus. *Rev Arg Microbiol*, 35:69-73.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA, V.D.; BRITO, M.F. & RIET-CORREA, F. (2006) Meningoencefalite e polioencefalomalácia causada por Herpesvírus Bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq Vet Bras*, 26:44-46.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.A.A. & BARROS, C.S.L. (2006) Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq Vet Bras*, 26:123-132.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. (2007) Meningoencefalite por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq Vet Bras*, 27:251-26.

ROEHE, P.M.; ALMEIDA, R.S.; TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; OLIVEIRA, E.A.S.; PETZHOLD, S.A.; SILVA, T.C. (1997). Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvirus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Arq Inst Biol, São Paulo*, 59:27-32.

ROIZMAN B., DESROSIERS R.C., FLECKENSTEIN B., LOPEZ C., MINSON A.C. & STUDDERT M.J. (1992). The family herpesviridae: an update. *ArchVirol*, 123:425-449.

ROIZMAN, B., PELLET, P.E. (2001). The family herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D.M., HOWLWY, P.M. *Field's Virology*, 4Ed. United States: Lippincott Williams & Wilkins, 1(71):23181-2398.

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

SALVADOR, S.W.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.A.R. (1998) Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq Vet Bras*, 18:76-83.

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*, 20:113-118.

SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; BRUM, M.C.S.; CANTO, M.C. (1998). Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5). *Pesq Vet Bras*, 18:99-106.

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

SOUZA V.F., MELO S.V., ESTEVES P.A., SCHMIDT C.S., GONÇALVES D.A., SCHAEFER R., SILVA T.C., ALMEIDA R.S., VICENTINI F., FRANCO A.C., OLIVEIRA E.A., SPILKI F.R., WEIBLEN R., FLORES E.F., LEMOS R.A., ALFIERI A.A., PITUCO E.M.; ROEHE P.M. (2002) Caracterização de herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq Vet Bras*, 22:13-18.

SPEAR P. G.; LONGNECKER R. (2003) Herpesvirus entry: an update. *J. Virol.*77(19):10179–10185.

SPILKI, R. R.; FRANCO, A. C.; TEXEIRA, 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*, 23:1-4.

STRAUB, O.C. (1982) Problems concerning the taxonomy of the “moval type” bovine herpesvirus. *Intervirology*. 28(1):1-7.

STRAUB, O.C. (1991) BHV-1 Infectious: Relevance and spread in Europe. *Compendium in immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 14(2):175-186.

STUDDERT, M.J. (1989) Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet Rec*, 125:584.

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

THIRY, J.; WIDÉN, F.; GRÉGOIRE, F.; LINDEN, A.; BELÁK, S.; THIRY, E. (2007) Isolation and characterization of a ruminant Alphaherpesvirus closely related to Bovine Herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. BMC Vet Res, 3:26.

USDA. United Stated Department of Agriculture. Livestock and poultry: world markets and trade. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2010/livestock_poultryfull101510.pdf>.

Acessado em: 14 de dezembro de 2014.

VALERA, A.R; COSTA, E.F.; TRAVERIA, G.; ALVARADO PINEDO, M.F.; CHIALVA, M.; GALOSI, C.M. (2000) Brote de meningoencefalitis por herpesvirus bovino (BHV-5): en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Med Vet, 17(4):84-87.

VOGEL, F.S.F.; 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 system of latently, experimentally infected calves. J Clin Microbiol, 41:4512-4520.

VOGEL, F.S.F.; LIMA M., FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER S.V., MAZZUTTI, K.C. & ARENHART, S. (2004) Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). Cienc Rural, 34:1619-1621.

WATT, J.A.; JOHNSTON, W.S., MACLEOD, N.S.; BORLOW R.M. (1981) Infectious bovine rhinotracheitis encephalitis. Vet Rec, 108:63-64.

WEIBLEN, R.; LOMBARRO, C.B.S.; CANABARRO, T.F. (1989). Bovine meningoencephalitis from IBR virus. Vet Rec,124: 666-667.

WELLENBERG, G.J.; MARS, M.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. (2001) Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Vet Microbiol*, 78(1); 79-84.

WELLS, G.A.H.; SCOTT, A.C.; JOHNSON, C.T. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121:419-420.

**5. CAPÍTULO 1 - Ocorrência do Herpesvírus Bovino 5 em Bovinos Procedentes de
Matadouros no estado de Pernambuco, Brasil.**

(Artigo a ser submetido ao periódico - *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*)

**OCORRÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO 5 EM BOVINOS
PROCEDENTES DE MATADOUROS NO ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL.**

**OCCURRENCE OF BOVINE HERPESVIRUS 5 IN SLAUGHTERED CATTLE
COMING FROM THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.**

**Salomé Gonçalves Simoes¹, Andréa Alice da Fonseca Oliveira^{1*} José Wilton
Pinheiro Junior¹, Diogo Manoel Farias da Silva², Adriana Soares Leite³, Vânia
Lúcia de Assis Santana⁴, João Gonçalves Simões⁵**

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. Cep: 52171-900. * Autor para correspondência: andreafo@hotmail.com

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. Cep: 52171-900. salomegsimoes@yahoo.com.br

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. Cep: 52171-900.

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. Cep: 52171-900. diogodmfs@hotmail.com

³ Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco – LANAGRO/PE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. Cep: 52171-030. adriana.leite@agricultura.gov.br

⁴ Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco – LANAGRO/PE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. Cep: 52171-030. vania.lucia@agricultura.gov.br

⁵ Universidade Federal de Campina Grande, Departamento de Medicina Veterinária - Avenida Universitária S/N – Bairro Santa Cecília, Patos, PB, Brasil. Cep: 58708-110. jgsimoes12@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se com este estudo pesquisar a ocorrência da infecção pelo Herpesvirus Bovino 5 (BoHV-5) pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com base em dois protocolos e analisar os achados histopatológicos de amostras de sistema nervoso central de bovinos. Foram obtidas 48 amostras de sistema nervoso central (SNC) de bovinos procedentes de três matadouros localizados no Sertão do Araripe, Pernambuco. Para análise molecular foram utilizados dois protocolos com diferentes *primers*. Com os iniciadores utilizados no protocolo 1 obteve-se 29,16% (14/48) das amostras positivas, no entanto, para os iniciadores utilizados no protocolo 2 todas as amostras resultaram negativas a qPCR. Com base na análise histopatológica das amostras provenientes de bovinos do matadouro de Ouricuri-PE foram evidenciadas

principalmente a presença de infiltrado linfocitário 90% (18/20), gliose 80% (16/20) e neuronofagia 80% (16/20). Em decorrência da diversidade de patógenos e similaridade das enfermidades neurológicas em bovinos, o uso de técnicas sensíveis e precisas como a qPCR, bem como *primers* que apresentem poucas reações cruzadas (dímeros) são fundamentais para a eficiência e o êxito do diagnóstico do BoHV-5.

Palavras-chave: biologia molecular, encefalite viral, histopatologia, ruminantes.

ABSTRACT

The object of the study was to research the DNA presence of Bovine Herpesvirus Type 5 through the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) based in utilization of two protocols and analyze the histopathological findings in samples of the cattle central nervous system. Forty-eight (48) cattle samples of the central nervous system samples were obtained from three slaughterhouses located in Araripe Wilderness in the state of Pernambuco. Under molecular analysis the efficiency of the protocols was compared using the following *primers*. With the primers used in protocol 1 there was obtained 29.16% (14/48) of the positive samples, however, the utilized primers in protocol 2 resulted in 100% of samples negative toward the qPCR. Based on histopathology analysis of central nervous system samples from Ouricuri-PE the following lesions became evident: lymphocytic infiltrate 90% (18/20), gliosis 80% (16/20) and neuronophagia 80% (16/20). As a result of the diversity of pathogens and similarity of neurological diseases in cattle, the use of sensitive and accurate techniques such as qPCR and primers that present few crossed reactions (dimers) are fundamentals to the efficiency and success of BoHV -5 diagnosis.

Keywords: molecular biology, viral encephalitis, histopathology, ruminants.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios do sistema nervoso central (SNC) em bovinos compreendem um grande grupo de doenças que determinam perdas econômicas e impactos na saúde pública (Lemos *et al.*, 2001; Galiza *et al.*, 2010). A variação e semelhança da manifestação clínica das neuropatias, bem como a diversidade de agentes infecciosos envolvidos e a dificuldade de diagnóstico, são aspectos importantes que limitam as ações de controle nessas enfermidades (Aquino Neto *et al.*, 2009).

Entre os agentes infecciosos envolvidos em doenças neurológicas estão as bactérias, protozoários e os vírus (Claus *et al.*,2002). Neste último grupo destacam-se os herpesvírus bovino, pois determinam perdas produtivas e reprodutivas significativas (Kirkbride *et al.*,1992; Junqueira *et al.*,2006; Rufino *et al.*,2006).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) vírus da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* está relacionado a enfermidade infecciosa viral aguda e altamente fatal descrita em diversos países. O BoHV-5 acomete o SNC e caracteriza-se ao exame histopatológico por quadro de meningoencefalite não supurativa com necrose em córtex cerebral (Roizman *et al.*,1992).

O diagnóstico das encefalites virais dos bovinos baseia-se na associação de dados epidemiológicos, sinais clínicos e resultados de exames laboratoriais *ante e post-mortem* (Colodel *et al.*,2002; Elias *et al.*,2004; Rissi *et al.*, 2006). Apesar da existência de diversos trabalhos na literatura utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ainda são escassos os estudos que envolvem o diagnóstico de BoHV-5 pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), destacando-se trabalhos de detecção do agente com sistema SYBR *Green*® em embriões bovinos (Cardoso *et al.*,2013) e em amostras parafinadas de cérebro bovino (Pedraza-Ordoñez *et al.*,2013).

Dessa forma, objetivou-se com este estudo pesquisar a ocorrência da infecção pelo Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em bovinos pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com base na utilização de dois protocolos e analisar os achados histopatológicos de amostras de sistema nervoso central de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

A pesquisa foi realizada em três matadouros que recebem inspeção sanitária municipal, localizados nos municípios de Exu, Bodocó e Ouricuri, Sertão do Araripe-PE (Figura 1). A região situa-se na extremidade noroeste do estado de Pernambuco, composta no total por 10 municípios, limitando-se com os Estados do Ceará e Piauí e com o Sertão Central e Sertão do São Francisco de Pernambuco.

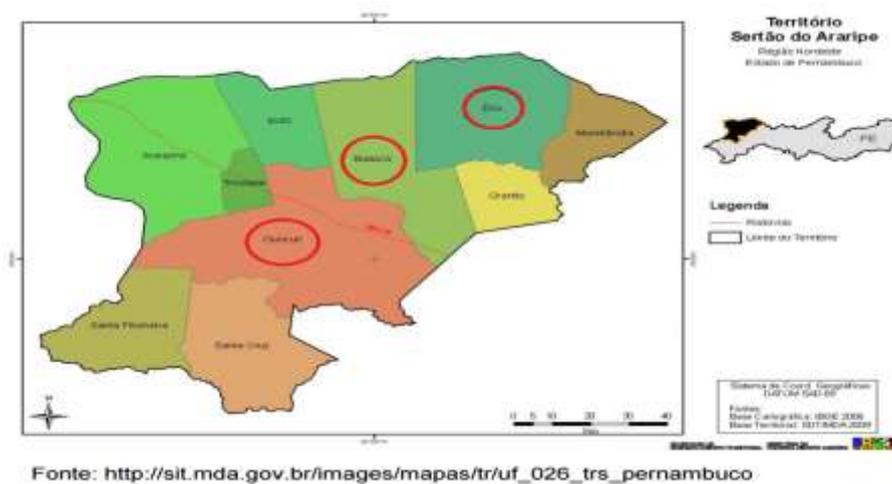


Figura 1 – Região do Sertão do Araripe, estado de Pernambuco. Em destaque (círculos) os municípios estudados.

Obtenção das Amostras

Foram coletadas 48 amostras de sistema nervoso central (hemisférios cerebrais, medula, tronco encefálico, cerebelo) de bovinos, de ambos os sexos e diferentes raças, sem sinais clínicos neurológicos, constatados na avaliação *ante mortem* nos respectivos matadouros. As amostras de tecido nervoso foram coletadas logo após o abate, na linha B foi efetuado o exame do conjunto cabeça-língua, nessa etapa a calota craniana foi aberta manualmente com emprego de machadinha. Após a coleta as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos, identificadas e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo posteriormente congeladas e encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFRPE e ao Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco – LANAGRO para realização da análise molecular. No município de Ouricuri foram coletadas 20 amostras que além de submetidas ao congelamento para análise molecular, foram destinadas a exame histopatológico, devidamente acondicionadas em frascos contendo formol tamponado a 10% e encaminhados ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE para processamento.

Processamento das Amostras

Processamento Histopatológico

Os fragmentos de tecido nervoso após fixação em formol tamponado a 10% foram processados pelos métodos usuais para análise histopatológica. Após a fixação foi realizada a desidratação dos fragmentos em banhos de álcool absoluto, seguido de diafanização em xilol, banho de parafina a 60°C e por fim os fragmentos foram incluídos em parafina. Posteriormente os blocos foram seccionados em micrótomo em fatias de 5µm e as lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (Luna,1968).

Extração de DNA Herpesvírus Bovino 5

De cada amostra obtida de SNC bovino foram separados fragmentos de hemisférios cerebrais, medula, tronco encefálico e cerebelo, acondicionados em microtubos de 2,0 mL, devidamente identificados e mantidos a – 80°C até o processamento.

O processo de extração do DNA do BoHV – 5 foi realizado segundo Maniatis *et al.* (1989). Após prévia maceração das amostras de encéfalo bovino utilizando cadinho e pistilo, o material obtido foi devidamente armazenado, posteriormente em tubo de polipropileno de 1,5 mL identificado foram adicionados 100µL da amostra macerada, 100µL de TE (Tris 10mM – EDTA 1mM pH 8,0) e 100µL de fenol equilibrado pH 8,0. Em seguida, a amostra foi homogeneizada por 1min em vórtex e centrifugada a 14.000 rpm por 5 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno identificado. A este foi adicionado 50µL de fenol, 50µL de clorofórmio e novamente a amostra foi homogeneizada por 1 min e centrifugada a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo de polipropileno identificado e acrescido de 100 µL de clorofórmio, realizou-se nova homogeneização da amostra por 1 min e centrifugação nas mesmas condições anteriores. Da mesma forma, em outro tubo de polipropileno, adicionou-se 10µL de acetato de amônio 3M, 100 µL de sobrenadante e 100 µL de isopropanol, a mistura foi mixada e incubada por 24h em freezer.

Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm durante 15 min, o sobrenadante desprezado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min a 4°C, desprezou-se o etanol 70% e o *pellet* foi deixado em temperatura ambiente até total secagem do tubo, ao *pellet* acrescentou-se 50 µL de água ultrapura.

Análise Molecular por PCR Real time (qPCR)

A presença do DNA do BoHV-5 nas 48 amostras do material submetido a extração foi analisada pela técnica de qPCR segundo metodologia descrita por Pedraza-Ordóñez *et al.* (2013). Foram utilizados dois protocolos, o protocolo 1 utilizando-se a sequência codificadora da glicoproteína C (gC) PF 5 'GTGGAGCGCCGCTTCGC-3' e PR 5 'TATCGCGGAGAGCAGGCG-3 gerando um produto de 236bp (NCBI, 2007) e o protocolo 2 sequência codificadora da glicoproteína G (gG) PF 5' TACGGACTGCCGGATTAACA-3', e 5' GTCACCACTA CCACCGCCGCCAACAT-3' apresentando 222bp (Engelhardt e Keil, 1996). A concentração dos iniciadores foi 200nm, as condições da reação foram as seguintes: 94°C durante 5 min, seguido 45 ciclos (94°C durante 15 sec, 60°C durante 30s para a

desnaturação e 72°C durante 30 segundos para emparelhamento e extensão). Os dados de fluorescência e os números do ciclo limiar (CT) foram determinados utilizando o Rotor-Gene Q Series Software 2.2.3 (Build 11) Copyright© 2012 QIAGEN GmbH.

A quantificação da qPCR foi determinada por meio da curva padrão, calculada pela análise de diluições seriadas do controle positivo, o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é o ciclo threshold (Ct), ele permite avaliar a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência emitida. O Ct é inversamente proporcional à concentração de DNA da amostra, um Ct baixo apresenta uma maior sensibilidade do teste e conseqüentemente uma melhor eficiência do teste, o Slope indica a eficiência da amplificação e um resultado -3.3 indicam 100% de eficiência.

Amostras de controle positivo do vírus, gentilmente cedidas pelo professor Dr. Rudi Weiblen do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foram incluídas no estudo como controle positivo e água ultrapura esterilizada foi utilizada como controle negativo.

Na eficiência do controle da quantificação do teste, foi realizado através da análise da curva padrão da qPCR/BoHV-5 frente aos dois *primers*, para o protocolo 1 o valor de M (*slope*) foi igual a -1,373 representando uma eficiência de 84% , o Ciclo Threshold (CT) alcançado B = 27.81 (Fig. 2)

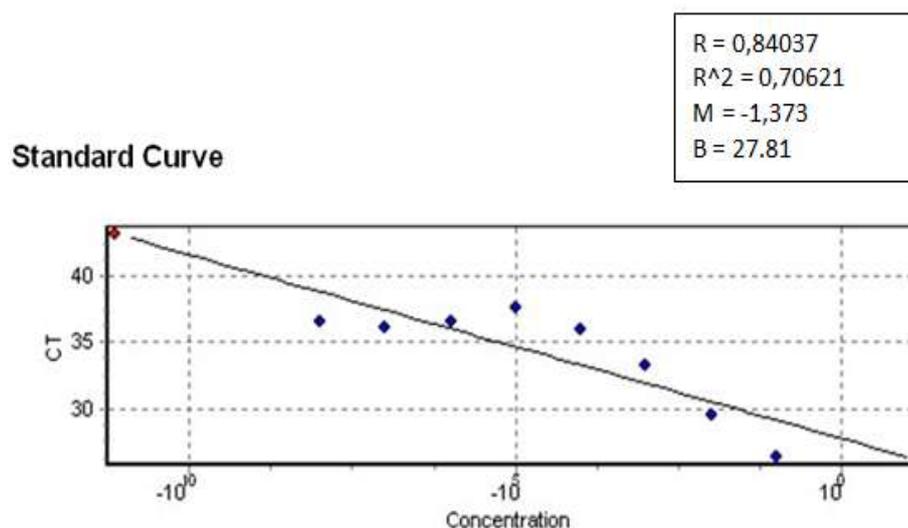


Figura 2 – Representação do teste de eficiência dos *primers* utilizados no protocolo 1 na qPCR-BoHV-5.

Na eficiência da qPCR/BoHV-5 para o protocolo 2 o valor de M (*slope*) foi igual a -3,709 representando uma eficiência de 99% e um CT de B = 14.08 (Fig. 3).

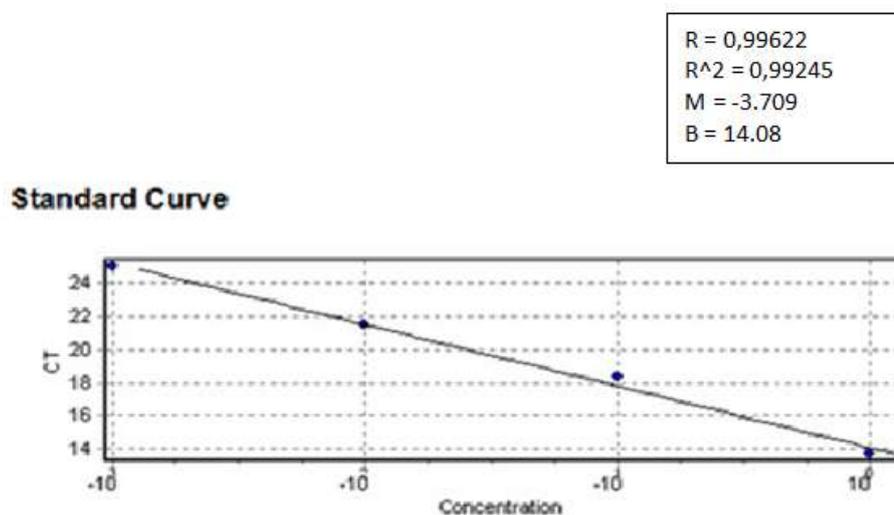


Figura 3 – Representação do teste de eficiência dos *primers* utilizados no protocolo 2 na qPCR-BoHV-5.

Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE (Licença nº 019/2013 de 18 de Março de 2013).

RESULTADOS

Das 48 amostras de encéfalo bovino submetidas à análise molecular pela qPCR verificou-se uma positividade de 29,16% (14/48) quando utilizou-se os iniciadores sugeridos pelo protocolo 1 e 100% de amostras foram negativas quando submetidas a análise seguindo o protocolo 2. A distribuição dos resultados da análise molecular por qPCR em relação aos municípios estudados encontra-se disposta na Tab. 1.

Tabela 1 – Distribuição dos resultados por município estudado em relação à análise molecular por qPCR, com base em dois protocolos utilizados.

Municípios	qPCR							
	Protocolo 1				Protocolo 2			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Exu	1	12,5	7	87,5	-	-	8	100
Bodocó	8	40	12	60	-	-	20	100
Ouricuri	5	25	15	75	-	-	20	100

Ao término de 45 ciclos, o perfil dos produtos formados foi exposto na curva de dissociação, através do aumento de 1°C a cada 5s, partindo de 60°C e terminando a 99°C. Nas Figuras 4 e 5 de acordo com o protocolo utilizado estão representados no eixo X os valores relativos à quantidade de BoHV-5 obtidos no controle positivo e nas amostras analisadas, enquanto no eixo Y são determinados os valores de temperatura de fusão na qual foi possível a amplificação das amostras.

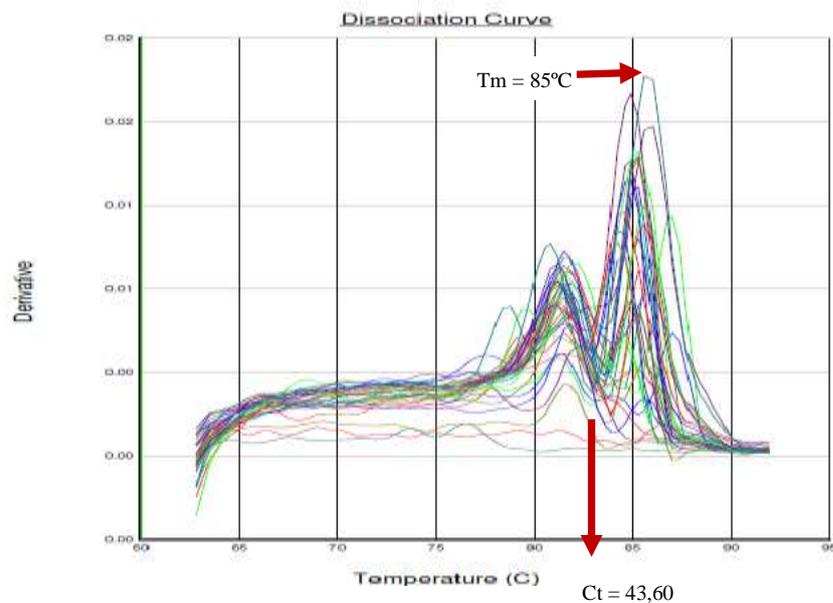


Figura 4 - Curva de Dissociação qPCR – BoHV-5 protocolo 1. Observar o surgimento de vários picos inespecíficos “dímeros”.

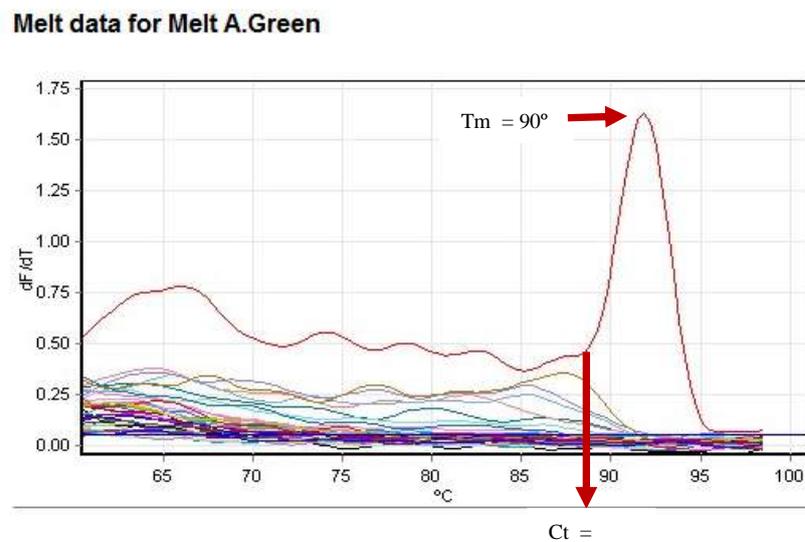


Figura 5 - Curva de Dissociação qPCR – BoHV-5 protocolo 2. Observar a presença de picos bem definidos.

Em relação aos protocolos analisados constatou-se que os iniciadores indicados no protocolo 1 favoreceram o aparecimento de vários picos inespecíficos para detecção do vírus (Fig. 4), por sua vez, os iniciadores utilizados no protocolo 2 resultaram em picos bem definidos no controle positivo (Fig. 5).

As amostras foram consideradas positivas, para ambos os protocolos, quando os valores do Ct estivessem de acordo com o valor do Ct previamente estabelecido pela curva padrão (limiar de detecção) e a temperatura de *melting* (Tm) do DNA amplificado correspondesse a do DNA padrão. A qPCR/BoHV-5 utilizando o protocolo 2, foi capaz de amplificar especificamente o DNA do BoHV-5 no controle positivo, o Ct encontrado foi 18.51, a temperatura de Melting entre 90°C e 95°C.

Durante a avaliação *ante mortem*, nenhum animal apresentou sinal clínico neurológico. No exame *post mortem*, não foram evidenciadas alterações macroscópicas significativas determinadas pelo BoHV-5 em nenhum animal.

Considerando os resultados da qPCR para o município de Ouricuri, em que 25% das amostras foram positivas ao protocolo 1 e ausência de positividade para o protocolo 2, observou-se na análise histopatológica das 20 amostras de SNC de bovinos as seguintes lesões: infiltrado linfocitário 90% (18/20), gliose 80% (16/20), neuronofagia 80% (16/20), edema 70% (14/20), macrófagos 65% (13/20), congestão 65% (13/20), desmielinização 45% (9/20), hemorragias 35% (7/20), necrose 15% (3/20), células gitter 5% (1/20), espongiase 5% (1/20) e manguito perivascular 5% (1/20). Os resultados referentes à análise molecular e achados histopatológicos por animal, para o município de Ouricuri encontram-se dispostos na Tab. 2.

Tabela 2 – Achados histopatológicos e análise molecular de amostras de SNC de bovinos procedentes do município de Ouricuri-PE.

Amostra	Achados Histopatológicos	qPCR Protocolo 1	qPCR Protocolo 2
O – 1	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, congestão, macrófagos, desmielinização, células gitter, manguito perivascular.	Negativo	Negativo
O – 2	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, desmielinização, necrose.	Negativo	Negativo
O – 3	Infiltrado linfocitário, neuronofagia, edema, espongirose.	Negativo	Negativo
O – 4	Gliose, neuronofagia, desmielinização, necrose por coagulação, manguito perivascular.	Negativo	Negativo
O – 5	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, desmielinização, manguito perivascular.	Negativo	Negativo
O-6	Gliose, neuronofagia, edema, congestão, macrófagos, desmielinização.	Positivo	Negativo
O - 7	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, congestão, macrófagos.	Negativo	Negativo
O – 8	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, desmielinização.	Negativo	Negativo
O – 9	Gliose, neuronofagia, edema, macrófagos.	Negativo	Negativo
O – 10	Infiltrado linfocitário, edema, congestão, macrófago, desmielinização, hemorragia.	Negativo	Negativo
O – 11	Gliose, edema.	Negativo	Negativo
O – 12	Edema, congestão, hemorragia.	Negativo	Negativo
O – 13	Neuronofagia, edema, congestão, macrófagos.	Positivo	Negativo
O – 14	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, macrófagos, manguito perivascular.	Positivo	Negativo
O – 15	Infiltrado linfocitário, edema, congestão, desmielinização, hemorragia.	Negativo	Negativo
O – 16	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, macrófagos, manguito perivascular.	Positivo	Negativo
O – 17	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema.	Negativo	Negativo
O – 18	Infiltrado linfocitário, gliose, edema, congestão, hemorragia.	Negativo	Negativo
O - 19	Hemorragias, edema, infiltrado perivascular, congestão, hemorragia.	Negativo	Negativo
O – 20	Infiltrado linfocitário, gliose, neuronofagia, edema, congestão, macrófagos.	Positivo	Negativo

DISCUSSÃO

Com base nas análises realizadas utilizando-se *primers* sugeridos no protocolo 1, obteve-se neste estudo um percentual de 29,16% de amostras positivas para BoHV-5, entretanto foram evidenciadas a presença de vários picos inespecíficos (dímeros) e um Ct (B = 21,06) , este fato também foi constatado por Pedraza-Ordoñez et al (2013).

Em relação ao protocolo 2 os resultados obtidos na qPCR indicaram 100% de negatividade para amostras de SNC dos bovinos analisados. Neste estudo, os *primers* empregados no protocolo 2 determinaram uma reação de melhor eficiência diagnóstica devido a inexistência de reações inespecíficas, Ct (B = 18.51), corroborando do mesmo modo, com os resultados obtidos por Pedraza-Ordoñez et al. (2013) que compararam a eficiência dos *primers* sugeridos por Campos et al. (2009) e Gomes et al. (2002).

Segundo Pedraza-Ordoñez et al. (2013) a diferença de desempenho entre *primers* pode estar relacionada a diversos fatores tais como: o mix utilizado na amplificação, a qualidade do material genético extraído ou ainda as características relacionadas aos iniciadores. Ressalta-se que nesse estudo utilizou-se as mesmas condições de extração e processamento para ambos os protocolos analisados. Deve-se considerar também o tipo de material biológico a ser analisado, uma vez que amostras procedentes de blocos de parafina, por exemplo, dificultam o processo de extração e amplificação.

É importante ressaltar que situações relativas às vantagens e desvantagens da qPCR podem ter influenciado o resultado desta pesquisa, pois a principal desvantagem desta técnica empregando-se o sistema SYBR® Green é poder gerar sinais falso-positivos, porque ele se liga a qualquer sequência dupla-fita de DNA, seja ela o alvo ou não. A desvantagem é a redução da especificidade ocasionada pelo aumento na emissão de fluorescência gerada por produtos de amplificação inespecíficos da PCR e dímeros de *primers* (Mackay *et al.*, 2002). Alguns pesquisadores ratificam essas diferenças observadas em relação à utilização do SYBR® Green, a exemplo do protocolo 1.

No presente estudo não foram observadas lesões macroscópicas no sistema nervoso central dos bovinos estudados, entretanto a literatura relata a existência de hiperemia difusa dos vasos das leptomeninges por toda a extensão do encéfalo (Carrillo *et al.*, 1983; Roizman *et al.*, 1992), edema e focos de hemorragia na superfície de corte do encéfalo em casos de animais com neuropatias (Dias *et al.*, 1982; Colodel *et al.*,

2002; Elias *et al.*, 2004). Neste estudo não foram detectados animais com sinais clínicos evidentes de neuropatias durante o exame clínico *ante-mortem* o que poderia justificar a ausência de lesões macroscópicas.

Já no que se refere às pesquisas em relação às lesões teciduais, na infecção por BoHV-5 tem sido relatada com frequência a participação de macrófagos denominados células gitter observados em áreas de malacia, que é uma característica neste tipo de reação inflamatória (Riet-Correa *et al.*, 1989), corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa, entretanto quando comparamos com os resultados obtidos na qPCR (protocolo 2) a presença deste tipo de célula pode ser considerado um achado inespecífico.

Sobre esse aspecto Cunha *et al.* (2009) afirmam ter encontrado lesões meningoencefálicas generalizadas caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório composto predominantemente por células mononucleares e acentuado infiltrado de células polimorfonucleares, necrose cerebrocortical e edema vasogênico moderado na área focal de malacia da substância cinzenta do córtex telencefálico com presença de células Gitter, ao exame histopatológico das amostras deste estudo foram observadas alterações semelhantes, entretanto pelo mesmo motivo supracitado podem ser considerados achados inespecíficos, considerando-se também outras possíveis doenças com envolvimento neurológico e achados microscópicos semelhantes.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que em decorrência da diversidade de patógenos e similaridade das enfermidades neurológicas em bovinos, o uso de técnicas sensíveis e precisas como a qPCR, bem como *primers* que apresentem poucas reações cruzadas (dímeros) são fundamentais para a eficiência e o êxito do diagnóstico do BoHV-5.

REFERÊNCIAS

- AQUINO NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; et al. Meningoencefalite por Herpesvirus Bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, n.1, p.1-5, 2009.
- CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T. et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol*, v.139, p.67–73, 2009.
- CARDOSO, T.C.; SILVA-FRADE, C.; TÁPARO, C.V.; OKAMURA, L.H. et al. Validation of a reference control for an SYBR-Green fluorescence assay-based real-time PCR for detection of bovine herpesvirus 5 in experimentally exposed bovine embryos. *Mol Cell Probes*, v.27, n.5, p.237-242, 2013.
- CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine virus necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentbl. Vet Med B*, v.30, p.161-168, 1983.
- CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus Bovino tipo 5 e Meningoencefalite herpética bovina. *Semina*, v.23, n.1, p.31-141, 2002.
- COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciênc Rural*, v.32, p.293-298, 2002.
- CUNHA P.H.J.; DELFIOL D.J.Z.; CAGNINI Q.D.; BADIAL P.R. et al. Identificação molecular do herpesvirus bovino tipo 5 em um bovino confinado associado com diagnóstico diferencial laboratorial de outras causas de polioencefalomalacia. *Anais 8º Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG. Ciênc Anim Bras*, v.1, p.93-98, 2009.
- DIAS, L.E.; MAISONNAVE, J.; GUARINO, H. Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) descripción de caso clínico em terneros de tambo. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINARIA, Montevideo, Uruguay. *Anais... Montevideo: Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*, p.521-530, 1982.

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

ENGELHARDT, T.; KEIL, G.M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology*, v.225, p.126-135, 1996.

GALIZA, G. J. N.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F. M.; DANTAS, S. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq Vet*, Rio de Janeiro, v.30, n.3, p.267-276, 2010.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P. et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.54, p.217-220, 2002.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina, Ciências Agrárias*, Londrina, v.27, n.2, p.289-298, 2006.

KIRKBRIDE, C. A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Inv Davis*, v.4, p.175-180, 1992.

LEMOS, R. A. A.; BRUM, K. B.; BERNADO, K. C.; KATAYAMA, K. A.; et al. Doenças caracterizadas por sintomatologia nervosa em bovinos no Mato Grosso do Sul. In: BARROS, S. L. C; LEMOS, A. A. R; CAVALLÉRO, M. C. J. Manual de procedimentos para diagnóstico histológico diferencial da Encefalopatia Espongiforme dos Bovinos (BSE). Rio de Janeiro, p.32-48, 2001.

LUNA LG. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology, 3rd edn. McGraw-Hill, New York, NY, 1968.

MACKAY, IM.; ARDEN, KE.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, p.1292–1305, 2002.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; & SAMBROOK, J. *Molecular Cloning; a Laboratory Manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Ministério do Desenvolvimento Agrário. 2011. Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável do Sertão do Araripe. Disponível em :

http://sit.mda.gov.br/download/ptdrs/ptdrs_qua_territorio081.pdf . Acessado em 09 de Agosto de 2015.

NCBI (The National Center for Biotechnology Information), 2007. Acesso em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/acc/nc/001847>. 22 de setembro de 2015.

PEDRAZA-ORDOÑEZ, F.; YAMATOJI, R.S.; ARAUJO JR, J.P.; ROCHA, N.S. et al. The use of real time PCR (qPCR) for the diagnosis of bovine herpesvirus 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain samples identified as bovine unspecific encephalitis. *J Vet Sci Technol*, v.4, p.5, 2013.

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

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq Vet Bras*, v.26, n.1, p.123-132, 2006.

ROIZMAN B.; DESROSIERS R.C.; FLECKENSTEIN B.; LOPEZ C. et al. The family herpesviridae: an update. *Arch Virol*, v.123, p.425-449, 1992.

RUFINO, F. A. L.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Impacto do herpesvírus bovino 1 e do vírus da diarréia viral bovina na transferência de embriões. *Arch Vet Sci*, Curitiba, v.11. n.1, p.78-84, 2006.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia *(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)*

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. Esclarecemos que o referido documento deve constar como sendo a primeira página do texto em Word (não incluir no texto em pdf), além da menção, em Material e Métodos, do número do Certificado de aprovação do projeto.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

▪ **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

▪ O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

▪ Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
 2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
 - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
 - **Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
 - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados.

Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).

- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
- ✓ *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.
- ✓ *Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

▪ Como referenciar

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostrídios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$150,00, por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.