

HANNA CAROLINA CAMPOS FERREIRA

**HERPESVÍRUS BOVINO (BoHV-1 E/OU BoHV-5): VIAS DE ELIMINAÇÃO,
VIREMIA E SOROLOGIA DE VACAS LEITEIRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F383h
2012

Ferreira, Hanna Carolina Campos, 1984-
Herpesvírus bovino (BoHV-1 e/ou BoHV-5) : vias de
eliminação, viremia e sorologia de vacas leiteiras
naturalmente infectadas / Hanna Carolina Campos Ferreira.
– Viçosa, MG, 2012.
viii, 56f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Abelardo Silva Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-56

1. Herpesvírus. 2. Bovino de leite. 3. *Bovine herpesvirus*.
4. Bovino de leite - Doenças. 5. Reação em cadeia de
polimerase. 6. Leite. 7. Saúde animal. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08969112

HANNA CAROLINA CAMPOS FERREIRA

HERPESVÍRUS BOVINO (BoHV-1 E/OU BoHV-5): VIAS DE ELIMINAÇÃO,
VIREMIA E SOROLOGIA DE VACAS LEITEIRAS NATURALMENTE INFECTADAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2012.

Ernani Paulino do Lago
(Coorientador)

Jackson Víctor de Araújo

Leandro Licursi de Oliveira

Abelardo Silva Júnior
(Orientador)

“Sempre há o que aprender, ouvindo, vivendo e, sobretudo, trabalhando. Mas só aprende quem se dispõe a rever as suas certezas.”

Darcy Ribeiro

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. (...) e aprender não pode dar-se fora da procura (...) e da alegria.”

Paulo Freire

DEDICATÓRIA

À minha querida e saudosa avó
Helenita Aguiar Campos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, direcionamento, oportunidade em continuar meus estudos e pelo crescimento pessoal em cada situação vivida.

Aos meus pais Mariane e Yulo por sempre estarem comigo na busca por meus objetivos, incentivando, apoiando, aconselhando. Agradeço-os também pelo amor e pelo exemplo de integridade.

Aos meus irmãos Hélida e Yulo César, e madrinha Isabel pelas orações, força, conselhos, sugestões, carinho e amizade e, mesmo à distância, por participarem de cada momento que vivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária pela acolhida e apoio institucional, acadêmico e financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Ao Professor Abelardo Silva Júnior pela excelente orientação, ensinamentos, paciência, conselhos, apoio total e constante presença durante todas as fases do Mestrado, pelo companheirismo, dedicação, amizade e por me receber no Laboratório de Virologia (LVA/DVT).

À Professora Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo pelo apoio, sr. Valdir Ferreira, Ethel Peternelli e ao pessoal do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) pela disponibilidade e auxílio.

Ao Professor Ernani Paulino do Lago pela constante co-orientação e amizade, e pela composição da comissão examinadora deste trabalho. Ao mesmo e aos Professores Pacífico Antônio Diniz Belém e Marco Túlio pelo auxílio na escolha das propriedades.

Aos Professores do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública/DVT pelo apoio.

Aos Professores Jackson Victor de Araújo e Leandro Licursi de Oliveira por aceitarem compor a comissão examinadora deste trabalho.

Ao pessoal do Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa (PDPL/RV), especificamente Marcus Moreira e André Lobato pela atenção e disponibilidade para reunir as propriedades cujos animais foram estudados neste

trabalho. Também agradeço a todos os estagiários pela forma profissional com que me acompanharam em todas as visitas a campo e pelo valioso auxílio nos momentos de coletas. Especificamente, Érico Rodrigues, Thiago Márcio, Marcelo Souza, Leonardo Amaral, Bruno Caixeta e Ramon.

Aos proprietários sr. Antônio Maria, Cristiano Lana, José Renato Miranda, Renato Santana, Danilo de Castro e sr. Caio pela abertura e disponibilidade para utilização dos seus rebanhos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Luís Augusto Nero e Eduardo Paulino da Costa pelo auxílio com as análises estatísticas.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Animal que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente Fernanda Carvalho e Marcus Rebouças pelo companheirismo, valioso auxílio e amizade.

À Sanely Lourenço, Cidnei, Luana Torres, Natália Tafuri, Marcos Antônio Santos, Laíne Ferreira, Ernandes e aos amigos e colegas do Departamento de Veterinária e da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio amigo.

Ao Luiz Carlos, Simone, Marcos Salgado, Élcio, Divino Fontes, Batalha, Dagoberto, Lucinda, Aécio, Isabel, Bete, Rosi e a todos os funcionários do Departamento de Veterinária pelo auxílio tantas vezes imprescindível para o desenvolvimento deste estudo e pela amizade construída com tantos.

Aos animais, cujas vidas são essenciais ao aprendizado.

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Situação da bovinocultura leiteira e sua relação com a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e com a Meningoencefalite Herpética Bovina	3
2.1.1 Ocorrência do <i>Bovine herpesvirus 1</i> (BoHV-1)	4
2.1.2 Ocorrência do <i>Bovine herpesvirus 5</i> (BoHV-5)	6
2.2 Propriedades gerais do BoHV-1 e do BoHV-5	7
2.2.1 Aspectos patogênicos do BoHV-1.....	9
2.2.2 Aspectos patogênicos do BoHV-5.....	12
2.3 Métodos de controle e perspectivas de tratamentos.....	13
2.4 Prenhez, imunodepressão animal e ativação viral.....	14
2.5 Vias de eliminação viral e diagnóstico da presença viral através da reação da polimerase em cadeia (PCR).....	16
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Local de execução do experimento.....	19
4.2 Utilização de animais para experimentação.....	19
4.3 Propriedades e amostragem	19
4.4 Sorologia	22
4.4.1 Células e vírus.....	22
4.4.2 Titulação viral	23
4.4.3 Avaliação de anticorpos	23
4.5 Medida dos níveis de cortisol no soro sanguíneo	24
4.6 Avaliação da presença viral em amostras de colostro/leite, sangue e secreção nasal ...	24
4.6.1 Extração de DNA das amostras	24
4.6.1.1 Obtenção do controle positivo para a reação da <i>Nested-PCR</i>	25
4.6.2 Padronização da reação da polimerase em cadeia pela técnica de <i>Nested</i> (<i>Nested-PCR</i>).....	25
4.7 Análises estatísticas.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Padronização da <i>Nested-PCR</i>	28
5.2 Influência do cortisol na eliminação viral a partir de duas diferentes fases da prenhez ..	30
5.3 Avaliação da eficiência do leite como alternativa de material para diagnóstico.....	32
5.3.1 Análise do leite como via de eliminação de BoHV-1 e/ou BoHV-5	32
5.3.2 Confronto entre eliminação viral via leite, secreção nasal, viremia e sorologia	35
5.3.2.1 Eliminação viral via leite e secreção nasal X Sorologia	35
5.3.2.2 Eliminação viral via leite X Via secreção nasal	36
5.3.2.3 Eliminação viral via leite X Viremia	37
5.3.2.4 Viremia X Sorologia.....	37
5.3.2.5 Viremia X Eliminação viral via secreção nasal.....	38
5.4 Caracterização da eliminação viral via leite em diferentes propriedades naturalmente infectadas	38
6. CONCLUSÕES	41
7. PERSPECTIVAS.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

FERREIRA, Hanna Carolina Campos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Herpesvírus bovino (BoHV-1 e/ou BoHV-5): vias de eliminação, viremia e sorologia de vacas leiteiras naturalmente infectadas.** Orientador: Abelardo Silva Júnior. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa, Ernani Paulino do Lago, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

A fim de esclarecer dados da dinâmica da infecção pelos *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) e/ou *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5), este trabalho visou comparar a eliminação dos referidos agentes virais em duas fases distintas da lactação (cinco meses antes e na época do parto) de vacas leiteiras naturalmente infectadas. Isso, de modo a relacionar a eliminação viral ao estresse periparto, tomando como parâmetro de análise dosagens do hormônio cortisol. Também foi investigada, através da *Nested-PCR*, a eliminação do DNA viral no colostro/leite, secreção nasal, viremia e, através da soroneutralização, a resposta sorológica de vacas leiteiras naturalmente infectadas. Foi demonstrado não haver diferenças dos níveis de cortisol entre as fases produtivas estudadas. Consequentemente, não houve diferenças na detecção do genoma viral e na resposta humoral das amostras clínicas focadas, considerando as duas fases estudadas. O leite se apresentou como uma alternativa amostral eficaz de diagnóstico da presença genômica do BoHV-1 e/ou BoHV-5. Em uma das propriedades de trabalho, praticamente 100% dos animais infectados estavam eliminando material genômico dos agentes, e houve uma média de 52% de frequência de positividade desse material eliminado no leite das vacas das demais propriedades. A frequência positiva de viremia se assemelhou àquela do leite em animais infectados, enquanto que a eliminação via secreção nasal apresentou baixa frequência de positividade, comparando ao leite. Isso sugere um prolongamento da época de eliminação via leite quando comparada à secreção nasal, concordando com a eficácia do leite como alternativa de material para diagnóstico viral. Sendo assim, conclui-se que a *Nested-PCR* é um método eficiente para o diagnóstico dos vírus deste estudo em leite e que essa amostra é promissora para o foco dos profissionais de campo, pois, além do diagnóstico ser possível na fase de infecção produtiva, há maior facilidade em sua coleta, quando comparada à coleta de sangue.

ABSTRACT

FERREIRA, Hanna Carolina Campos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Bovine herpesvirus (BoHV-1 e/ou BoHV-5): the process of elimination, viremia and serology of naturally infected dairy cows.** Adviser: Abelardo Silva Júnior. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa, Ernani Paulino do Lago, Gustavo Costa Bressan and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

In order to clarify data on the dynamics of infection by Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and / or Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5), the aim of this study was to compare the viral clearance of BoHV-1 and/or BoHV-5 in two distinct phases of lactation (five months before and at parturition) of naturally infected dairy cows. Measurements of the cortisol hormone were used as an analysis parameter in order to relate viral shedding to post partum stress., The elimination of viral DNA in colostrum / milk, nasal secretions and viremia was investigated by nested PCR. The antibody response of cattle naturally infected was investigated by neutralization. There was no difference in cortisol levels between the two lactation phases. Therefore, there was no difference in viral genome detection and antibody responses of the tested samples, considering the two studied phases. Milk was an effective sample alternative for genomic diagnosis of BoHV-1 and/or BoHV-5. In one of the properties studied, close to 100% of infected animals were shedding viral DNA, and the mean frequency of milk shedding in cows from other properties was only 52%. The positive viremia rate was similar to the one observed in the milk of infected animals, while viral clearance in nasal discharges had low positivity rate, compared to milk. This suggests an extended shedding time in the milk, when compared to other dissemination routes. This information corroborates with milk efficacy as a sample alternative for viral diagnosis. Thus, in this study, *Nested-PCR* is an efficient tool for the viral diagnosis in milk. Milk is a promising sample for field practitioners because not only does it allow for productive infection diagnosis, it is easier to collect compared to blood.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de criação da pecuária leiteira sofreram modificações ao longo do tempo visando aperfeiçoar e melhorar a qualidade do seu produto final: o leite. Para isso, a saúde animal é levada em conta, abrangendo a análise da qualidade nutricional, do conforto e sanitária do ambiente.

Há determinadas enfermidades que ocorrem diretamente devido à depressão do sistema imunológico animal, além, obviamente, da presença do agente causador no ambiente. A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e a Meningoencefalite Herpética Bovina, enfermidades virais causadas pelo *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) e *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5), respectivamente, promovem infecções crônicas nos animais pelo estabelecimento do mecanismo de latência (Flores - org., 2007). Ambas causam importantes danos sanitários aos bovinos e, conseqüentemente, à economia de uma região ao provocar prejuízos na produtividade animal. São enfermidades diretamente relacionadas à depressão imunológica, visto que seus agentes causadores, presentes no organismo hospedeiro, têm sua virulência reativada conforme a condição estressante à qual o animal esteja submetido (Rock et al., 1992). Essa condição é intimamente relacionada à debilidade do sistema imune (Ackermann et al., 1982). Determinadas condições estressantes ligadas ao sistema de criação favorecem a manifestação das enfermidades, tais como desconforto no momento da ordenha ou durante os momentos de descanso, ruminação e alimentação (Pimentel, 1983); intervenções de profissionais pecuários ou maus-tratos pelos funcionários da fazenda; excesso de barulho (Resende, 2001).

Instaladas as enfermidades no animal, há contaminação do restante do rebanho pelas secreções orgânicas, principalmente pela via oronasal. Contudo, a eliminação e a contaminação via leite aos demais animais da propriedade ainda não são totalmente esclarecidas. Essa informação tem importância no que diz respeito à distribuição do leite total do rebanho, ou seja, de animais não-infectados e possivelmente infectados que não estejam manifestando os sinais da doença, a todos os bezerros recém-nascidos, o que acabaria potencializando a disseminação viral àqueles animais livres do agente.

Uma vez que o BoHV-1 e o BoHV-5 são amplamente distribuídos na população bovina e estabelecem infecção crônica, o presente estudo investigou pontos da

patogenia viral ainda pouco esclarecidos: (1) É possível que o leite seja uma importante via de eliminação viral? (2) A depressão imunológica periparto pode interferir na eliminação viral?

Dessa forma, percebeu-se a necessidade de investigar e esclarecer esses aspectos da patogenia do BoHV-1 e/ou BoHV-5 em rebanhos de vacas leiteiras naturalmente infectadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Situação da bovinocultura leiteira e sua relação com a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e com a Meningoencefalite Herpética Bovina

O crescimento efetivo da bovinocultura leiteira nacional é incontestável. Segundo dados do IBGE (2011), no ano de 2010, o rebanho bovino nacional compreendeu 209,5 milhões de cabeças, demonstrando um aumento de 2,1% em relação ao ano anterior, com maiores concentrações no Centro-Oeste, Norte e Sudeste.

Ainda em 2010, a produção de leite bovino cresceu 5,5% quando comparada a 2009, alcançando 30,7 bilhões de litros. Em todo o Brasil, 22,9 milhões de vacas foram ordenhadas, representando 10,9% do rebanho total de bovinos. A região Sul do país apresentou a maior produtividade (2.388 litros/vaca/ano), destacando o Estado de Santa Catarina (2.432 litros/vaca/ano). O mesmo foi seguido por Minas Gerais, responsável por 27,3% da produção nacional do referido produto, Rio Grande do Sul (11,8%) e Paraná (11,7%) (IBGE, 2011). Contudo, essa produção poderia ter se apresentado maior, caso o controle de patógenos específicos do sistema reprodutivo fosse intensificado.

Quando se trabalha com bovinocultura leiteira, deve-se pensar no controle dos custos relativos ao sistema a fim de se obter um produto final acessível economicamente e de qualidade. Todo fator, seja ele infeccioso ou não, que altere o intervalo de partos (IP) e o período de serviço (PS), afeta a produtividade leiteira, pois o resultado final será sempre o menor número de nascimentos e consequentemente a redução da produção de leite (Junqueira & Alfieri, 2006).

Segundo os mesmos autores, as principais consequências relacionadas a fatores infecciosos na produção de vacas leiteiras são mortalidade embrionária precoce ou tardia, abortamentos, mortalidade perinatal e neonatal, além de possível quadro neurológico letal de bezerras. Caso uma vaca não produza um bezerro por ano, há despesas sem retorno de US\$ 77,97 no mesmo período.

Em um rebanho bovino leiteiro sadio, as vacas retornam ao cio decorridos 30 dias do parto, têm 83 dias como período de serviço, produzem leite durante 10 meses, o IP é de 12 meses e o período seco compreende 2 meses. Nessas

condições, pode-se conseguir que 83,3% das vacas em produção estejam em lactação durante o período de um ano. Supondo que o período de lactação seja mantido, mas que o período seco aumente para 4 meses devido a um problema infeccioso ou não, o IP consequentemente irá aumentar para 14 meses. Dessa forma, 71,4% das vacas estarão em lactação naquele mesmo período de tempo (Gonçalves, 2008), com uma queda de 11,9% na produtividade animal.

Segundo dados da EPAGRI - SC (2010-2011), o custo variável médio/vaca relativo a gastos com sanidade é de R\$ 75,22 no Estado. Dessa forma, a maneira ideal de minimizar as perdas de lucros no setor é aumentar de forma racional as taxas de fertilidade do rebanho. Isso é alcançado através de um conjunto de fatores, aos quais são incluídos melhoria genética e de pastagens, implantação de biotécnicas de reprodução e, principalmente, investimento na saúde animal através do controle dos agentes infecciosos que afetam a reprodução (Junqueira & Alfieri, 2006).

2.1.1 Ocorrência do *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1)

O BoHV-1 foi isolado pela primeira vez em 1950, nos Estados Unidos, mas somente na década de 60 os sinais respiratórios graves da infecção por esse agente tornaram-se preocupação. Já no Brasil, foi isolado em 1978 no estado da Bahia a partir de pústulas vaginais. Em São Paulo, o BoHV-1 foi isolado de um rim de feto bovino proveniente de abortamento (Rocha et al., 2001; Andrade, 2006).

Esse agente viral pode ser classificado em dois grupos, de acordo com suas propriedades patogênicas: o grupo respiratório/abortogênico e o grupo genital/não-abortogênico. O BoHV-1.1 se refere aos isolados com tropismo pelo trato respiratório, causando a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), e o BoHV-1.2 inclui as amostras virais relacionadas à infecção genital, causando a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e a Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB). Essa classificação esporadicamente pode sofrer variações, podendo as duas classes do BoHV-1 causar doenças respiratórias e genitais (Andrade, 2006).

O BoHV-1 está presente em rebanhos bovinos de todas as idades de praticamente todo o mundo (Jones & Chowdhury, 2008). Contudo, as taxas de rebanhos e animais portadores do vírus variam consideravelmente. Na maioria dos

países europeus, a situação é endêmica e as taxas de infecção descritas são muito variáveis. Na Grã-Bretanha, o percentual de rebanhos soropositivos atinge entre 40 e 50% e, na Bélgica, 62%. Por outro lado, em 2004, Dinamarca e Suíça, após implantação de um rígido programa de erradicação com o sacrifício dos animais portadores, obtiveram a condição de países livres do vírus (Ackermann & Engels, 2005).

A infecção apresenta caráter endêmico na América do Norte e os sinais clínicos são controlados através de programas de vacinação (Durham & Hassard, 1990).

No que se refere ao Brasil, um estudo realizado no estado de Goiás demonstrou uma taxa de prevalência de 51,9% (Barbosa et al., 2005). No Estado do Paraná, em um estudo considerando propriedades com histórico de problemas reprodutivos, 41,9% dos animais e 90,5% dos rebanhos com aptidão leiteira foram positivos para o BoHV-1 (Médici et al., 2000). No estado do Rio Grande do Sul, Holz et al. (2008) relataram uma prevalência de 29,2% de animais soropositivos para BoHV-1 e BoHV-5. Dias et al. (2008) verificaram prevalência de 64,41% na região oeste do estado do Paraná. Rocha et al. (2001), em uma pesquisa realizada a partir de amostragem de demanda recebida espontaneamente no período de 1990 a 1999, testaram 5.511 soros de bovinos provenientes de propriedades particulares localizadas em 335 municípios do Estado de Minas Gerais para diagnóstico. Entre os 335 municípios remetentes de soros para diagnóstico sorológico, 313 (93,4%) apresentaram pelo menos um bovino com sorologia positiva. Adicionalmente, dos 5.511 soros testados, 3.206 (58,2%) apresentaram anticorpos contra o BoHV-1.

Como pode ser observado, no Brasil e em outros países, o BoHV-1 está amplamente distribuído, afetando bovinos de corte e leite. A diversidade de resultados de prevalência encontrada na literatura está relacionada ao uso de diferentes técnicas de amostragem, diagnóstico laboratorial, características regionais e aplicação de programas de combate (Del Fava et al., 2002).

2.1.2 Ocorrência do *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5)

O BoHV-5 é o agente viral causador da Meningoencefalite herpética bovina (MEH). Apresenta distribuição geográfica limitada, com maior ocorrência em países sulamericanos e esporadicamente em outros continentes. Esse vírus é antigenicamente relacionado ao BoHV-1, apresentando homologia genômica de 82% (Delhon et al., 2003), o que leva a informações não-esclarecidas acerca da sua real prevalência (Del Médico Zajac et al., 2010) e de suas formas de controle (Thiry et al., 2001). Há estudos demonstrando que o BoHV-1 pode causar sinais clínicos da MEH (Silva et al., 2007).

Essas questões limitam a ocorrência de muitos estudos relacionados à vacinação contra esse agente devido à dificuldade em reproduzir a doença clínica associada especificamente à infecção pelo BoHV-5 (Del Médico Zajac et al., 2010).

A MEH foi inicialmente identificada na Austrália (Johnston et al., 1962) e o BoHV-5 foi primeiramente isolado por French (1962). Embora primordialmente classificado como BoHV-1 subtipo 3 devido às características moleculares semelhantes ao BoHV-1, a partir de estudos comparativos de cepas dos dois agentes submetidas a ensaios de mapeamento do DNA (Brake & Studdert, 1985), neutralização cruzada (Bagust & Clarck, 1972) e reatividade de anticorpos monoclonais (Metzler et al., 1986), o Comitê Internacional de Taxonomia Viral reconheceu o agente (Roizman et al., 1992) e o reclassificou como uma espécie distinta do BoHV-1 devido às suas características neurotrópicas (Del Médico Zajac et al., 2010).

O BoHV-5 acomete principalmente animais de até 6 meses de idade com doença neurológica rápida e letal (Schudel et al., 1986), apresentando índices de morbidade entre 0,05% e 5%, e de letalidade quase sempre chegando a 100% (Rissi, 2006). Também pode ser desenvolvida infecção subclínica ou doença com sinais moderados, tipos de infecções estas relacionadas à variação da virulência das cepas e fatores relacionados ao hospedeiro, como idade e desempenho imunológico (Del Médico Zajac et al., 2010).

Quanto à prevalência, vários surtos de meningoencefalite em bovinos foram descritos na Austrália (French, 1962; Johnston et al., 1962; Gardiner et al., 1964), Hungria (Bartha et al., 1969), Estados Unidos (Reed et al., 1973; D'Offay et al., 1993), Canadá (Gough & James, 1975), Argentina (Carrillo et al., 1983; Perez et al.,

2003), Brasil (Riet-Correa et al., 1989, 2006; Salvador et al., 1998) e Europa (Moretti et al., 1964; Bartha et al., 1969).

Ainda há a ocorrência de co-infecções com BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos leiteiros. Campos et al. (2009) encontraram 75,9% de frequência de animais infectados com ambos os agentes virais na região Sul do Brasil.

2.2 Propriedades gerais do BoHV-1 e do BoHV-5

BoHV-1 e BoHV-5 pertencem à ordem *Herpesvirales*, a qual se constitui por três famílias de herpesvírus denominadas *Alloherpesviridae*, *Herpesviridae* e *Malacoherpesviridae* (ICTV, 2009). Os membros da família *Herpesviridae* são vírus de DNA que apresentam um sucesso evolucionário significativo. O nome, derivado do grego *herpein*, cujo significado é rastejar, refere-se às lesões características causadas por muitos herpesvírus (Thiry et al., 2006). Essa família inclui cerca de duzentos vírus isolados de diversos hospedeiros, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Na natureza, muitos herpesvírus são intimamente associados a uma única espécie de hospedeiro. A susceptibilidade do hospedeiro aos herpesvírus indica que estes têm se envolvido de modo a permitir íntima adaptação com seus hospedeiros (Davison, 2002).

A família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias denominadas *Alpha*-, *Beta*- e *Gammaherpesvirinae*. A *Alphaherpesvirinae* contém quatro gêneros: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*. Dentro do gênero *Varicellovirus*, há dezessete espécies que acometem variadas espécies hospedeiras. Entre essas dezessete espécies, encontram-se o BoHV-1 e o BoHV-5 (ICTV, 2009).

Os vírions da família *Herpesviridae* consistem de um núcleo contendo uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) de fita dupla linear contendo tipicamente 60 a 120 genes; um capsídio icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro contendo 162 capsômeros envolvendo o núcleo; uma camada protéica amorfa que recobre o capsídio e ainda de um envelope lipoprotéico contendo espículas de glicoproteínas (Figura 1) (Zhou et al., 1994; Murph et al., 1999). Essa estrutura confere pouca estabilidade aos membros da família *Herpesviridae*, sendo considerados frágeis a diversos fatores ambientais (Jawetz et al., 1973; Roizman et al., 1992).

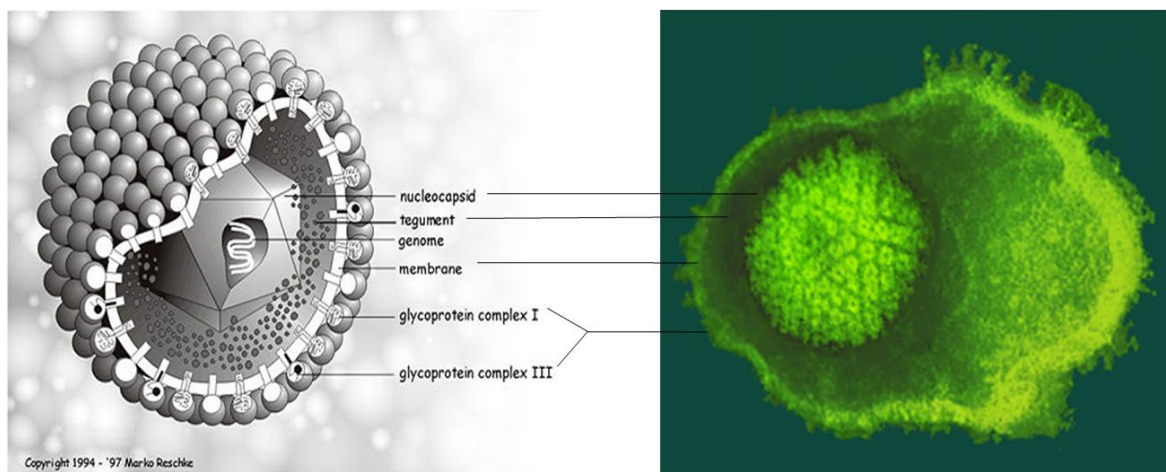


Figura 1. Morfologia de um membro da família *Herpesviridae*: nucleocapsídeo, tegumento (camada protéica amorfa), genoma, membrana incluída no envelope, glicoproteínas do envelope.
 Fonte: Adaptado dos sites de internet "The Big Picture Book of Viruses: Herpesviridae" e "Herpesvirus".

Os vírus da *Alphaherpesvirinae* são caracterizados por um curto ciclo de replicação e pela capacidade em induzir infecção latente, principalmente, mas não exclusivamente, em neurônios (Roizman & Pellett, 2001).

A capacidade dos herpesvírus de causar infecções latentes duradouras em hospedeiros naturais ou em modelos experimentais, sem causar doença grave ou mortalidade, possibilita a transmissão viral de uma forma eficaz (Field et al., 2006). A infecção latente é caracterizada pela presença do genoma viral sem a expressão gênica significativa, replicação do genoma ou produção viral. Geralmente, em situações associadas ao estresse, a expressão gênica é ativada, provocando replicação viral e, por consequência, reativação da infecção (Rock et al., 1992). Ocasionalmente, a reativação da infecção vem acompanhada de sinais clínicos e lesões nos locais de replicação, que correspondem aos sítios de infecção primária (Flores et al., 2005).

2.2.1 Aspectos patogênicos do BoHV-1

Dentre os alphaherpesvírus que infectam naturalmente os ruminantes, o protótipo é o BoHV-1, o qual é associado a uma variedade de sinais clínicos, como conjuntivites, encefalites e abortamentos, e a três síndromes nos bovinos: rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV – fêmeas) e balanopostite pustular infecciosa (IPB – machos) (Silva et al., 2007). Um dos efeitos mais graves e importantes provocados pelo BoHV-1 é a morte embrionária ou fetal em animais gestantes quando a infecção se torna sistêmica (Canant, 1984).

As infecções latentes do BoHV-1 se apresentam em três fases: uma infecção preliminar, com duração de cerca de duas semanas; uma prolongada infecção latente; e uma ocasional recrudescência viral, reativando a disseminação viral a outros animais (Muylkens et al., 2007). Essa reativação pode ser devido a condições estressantes (liberação endógena de hormônios esteróides) ou artificiais (administração exógena de altas e prolongadas doses de corticosteróides) e ocorre, usualmente, subcl clinicamente. Assim, o controle da enfermidade torna-se difícil, pois animais que não apresentam sinais clínicos são capazes de liberar vírus ao ambiente e infectar outros animais susceptíveis (Straub, 2001).

A espécie bovina é a principal fonte de infecção pelo BoHV-1. As principais vias de eliminação do vírus são: secreções respiratórias, oculares e genitais (mucos prepucial e vaginal) e sêmen de animais infectados (Flores – org., 2007). O sêmen geralmente é contaminado durante a ejaculação por contato com o vírus presente na mucosa prepucial. A via de transmissão horizontal é a mais importante e ocorre através do contato direto entre os animais e também pela cópula, porém embrião e feto podem infectar-se pela via vertical (transplacentária). A transmissão indireta ocorre principalmente por aerossóis ou fômites contaminados, tendo a inseminação artificial importante papel na entrada da infecção em rebanhos que nunca tiveram contato com o vírus (Lemaire et al., 1994).

A porta natural de entrada do BoHV-1 nos hospedeiros são as membranas mucosas do sistema respiratório superior, do epitélio conjuntival e do trato genital. O vírus interage através das suas glicoproteínas de superfície (gB, gC, gD) com a membrana da superfície celular do local. A partir daí, alcança o ambiente citoplasmático e inicia um ciclo replicativo lítico de modo a permitir sua expressão

gênica para a produção de novas progênes virais. Isso resulta na morte celular, o que leva à liberação de grande quantidade dessas progênes por meio das secreções corpóreas (Muylkens et al., 2007). O vírus alcança, então, a circulação sanguínea e é disseminado através das células pelas quais apresenta tropismo (monócitos e macrófagos) para outros locais do organismo. Dessa forma, o vírus atinge o trato reprodutivo da fêmea (ovários, útero, placenta e, conseqüentemente, feto), ocasionando falhas na reprodução (Pituco, 2009). Também invade as terminações nervosas, permanecendo de forma latente principalmente nos gânglios trigêmeos e sacrais.

Ainda segundo Pituco (2009), os mecanismos de defesa do animal promovem a destruição de células infectadas e a neutralização de partículas virais. A imunidade mediada por células é a mais importante na IBR/IPV, tendo em vista a multiplicação intracelular do agente, inacessível aos anticorpos. O combate ao agente depende da eficiência dos mecanismos de defesa do animal, adoecendo aqueles que têm esses mecanismos comprometidos. Anticorpos contra o BoHV-1 são produzidos a partir do oitavo dia após a infecção e persistem por toda a vida do animal.

A complicação mais comum provocada pelo BoHV-1 nos animais imunodeprimidos é o abortamento. Caso a vaca prenhe for portadora do BoHV-1, é capaz de transmiti-lo ao feto, o qual pode vir a termo de modo débil e continuar como portador e disseminador do vírus quando em situações estressantes (Miller, 1991). Contudo, também pode haver abortamento principalmente a partir do segundo mês de gestação devido à degeneração dos placentomas. O abortamento pode coincidir com os sinais respiratórios ou ocorrer sem outra manifestação clínica no animal. O feto geralmente está autolisado. Placenta e feto não apresentam alterações macroscópicas típicas (Pituco, 2009).

Os principais sinais clínicos podem aparecer em dois a três dias após a infecção pelo BoHV-1, com o animal apresentando febre, inapetência, aumento da frequência respiratória, rinotraqueíte e conjuntivite. A severidade dos achados clínicos parece estar relacionada à amostra do vírus, ao estado imunológico do animal no momento da infecção, aos agentes estressores ambientais e à idade do animal (Lemaire et al., 1994; Tikoo et al., 1995).

A enfermidade genital, caracterizada pela vulvovaginite pustular infecciosa das vacas e a balanopostite infecciosa dos touros, apresenta lesões de aspecto focal, que surgem como pequenas pápulas eritematosas na mucosa vaginal e prepucial,

evoluindo para pústulas. As mucosas vaginal e prepucial tornam-se edemaciadas, os animais apresentam micção frequente e as fêmeas levantam a cauda devido ao incômodo (Rocha, 2001). A primo-infecção pode trazer perdas por problemas reprodutivos e respiratórios, principalmente pelo aparecimento de sintomas clínicos em animais soronegativos, pois o animal não apresenta ainda resposta imunológica contra o BoHV-1 (Lemaire., et al, 1994).

O BoHV-1 não provoca viremia em animais adultos não prenhes (Engels & Ackermann, 1996). Entretanto, pode haver viremia, infecção fetal, morte e abortamento seguido de infecção genital em vacas prenhes (Gibbs & Rweyemamu 1977; Kahrs, 2001), e viremia fatal em bezerros recém-nascidos na ausência de anticorpos maternos no leite (Mechor et al., 1987).

A infecção causada pelo BoHV-1 pode interferir nos índices reprodutivos dos plantéis infectados. Estudos relacionados à infecção experimental em fêmeas encontraram resultados diferentes quanto à patogenicidade do BoHV-1 sobre a reprodução. Allan et al. (1975) não observaram efeito na prenhez dos animais. Miller & Van Der Maaten (1985) relataram que novilhas inoculadas via intrauterina com cepas isoladas de feto abortado apresentaram lesões macroscópicas e microscópicas no corpo e cornos uterinos. Os mesmos autores observaram o efeito da inoculação intravenosa em vacas de uma cepa de BoHV-1 isolada de quadro respiratório. Com inoculação realizada entre 7 a 14 dias após a cobertura, o conceito se apresentou degenerado e infectado pelo BoHV-1. González (1996) isolou BoHV-1 de tecido ovariano, oviduto e endométrio de vacas com repetição de cio, sendo observadas, pela histopatologia, lesões necróticas nas células da granulosa, salpingite e endometrite.

A confirmação do agente etiológico é realizada por isolamento e identificação a partir de amostras de secreção nasal, ocular, prepucial ou vaginal, sêmen, lavado uterino de coleta de embrião, vísceras de animais necropsiados, vísceras de fetos abortados e placenta. O sorodiagnóstico é a forma indireta para verificar se o bovino está infectado com o vírus, empregando a soroneutralização ou o teste ELISA. Amostras pareadas podem ser utilizadas para avaliar a soroconversão (Del Fava et al., 2002).

2.2.2 Aspectos patogênicos do BoHV-5

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). Segundo os mesmos autores, BoHV-1 e BoHV-5 apresentam 82% de aminoácidos idênticos em suas estruturas, e a maioria das suas proteínas semelhantes participam dos processos de replicação de DNA viral. Dessa forma, a maioria dos testes sorológicos e virológicos não são capazes de distinguir os dois agentes, o que leva ao pouco conhecimento acerca da história natural do BoHV-5 (Flores – org., 2007).

O BoHV-5 causa quadro de meningoencefalite necrosante principalmente em bovinos jovens. É transmitido, provavelmente, via contato direto ou indireto de animais ou secreções contaminadas, ou seja, de forma semelhante ao BoHV-1. Embora penetre pelo trato respiratório superior e se replique inicialmente nesse local, os sinais de infecção respiratória semelhantes aos causados pelo BoHV-1 são mais brandos. O agente desenvolve latência no gânglio trigêmeo, mas, diferentemente da via reprodutiva tomada pelo BoHV-1, o BoHV-5 segue para o encéfalo, atingindo ponte, bulbo, cerebelo, tálamo e córtex cerebral, desenvolvendo, assim, a degeneração do órgão (Del Médico Zajac et al., 2010).

Alcançando o encéfalo, a partir do 9º ou 10º dia pós-infecção, o agente provoca sinais de ataxia, andar em círculos, tremores musculares, convulsões, opistótono, nistagmo, bruxismo, os quais progridem e evoluem em 15 dias até ocasionar a morte do animal (Diel et al., 2005; Isernhagen, 2005; Figueiredo, 2009).

Segundo Flores (org., 2007), com o há desenvolvimento de doença neurológica fatal, deve ser realizado diagnóstico diferencial com os agentes da Encefalopatia Espongiforme Bovina, Listeriose, Babesiose e Raiva. A partir de material coletado de cérebro, são realizados testes de inoculação intracerebral em animais de laboratório (específico para confirmação de Raiva), imunofluorescência/imunoperoxidase, isolamento viral ou reação da polimerase em cadeia.

À necropsia, bovinos acometidos por BoHV-5 podem ou não apresentar alterações no sistema nervoso (Colodel et al., 2002). Quando apresentam, podem se distribuir difusa ou localmente (tálamo, córtex frontal, núcleos basais) com hiperemia, edema, hemorragia na substância branca ou cinzenta ou sob as meninges, além de degeneração tecidual (Gardiner et al., 1964; Colodel et al., 2002; Elias et al, 2004).

2.3 Métodos de controle e perspectivas de tratamentos

Diante da inexistência de tratamento, as medidas de controle são fundamentais para impedir o avanço da doença nos rebanhos bovinos. Essas medidas incluem prevenção da introdução de animais positivos em rebanhos negativos e técnicas eficientes de manejo de modo a evitar o estresse aos animais, sendo este intimamente relacionado à reativação do agente viral em estado de latência (Stancioli, 2003). Em relação às vacinas, tanto as vivas quanto as inativadas são inconvenientes por serem contra-indicadas para gado jovem ou prenhe, terem eficácia incerta, interferirem no diagnóstico sorológico e transmitirem o vírus por meio da vacina viva ao gado não-vacinado (Kahrs 2001; Lovato et al., 2003). Aquelas comercializadas atualmente contra o BoHV-1 previnem o desenvolvimento de sintomas clínicos do quadro respiratório e reduzem a eliminação de partículas virais. No entanto, não impedem a infecção viral, a latência (Ackermann et al., 1990; Osório, 1998) e nem o quadro reprodutivo.

Ainda não existem vacinas comercializadas para combater o BoHV-5. Entretanto, sua estreita relação sorológica e molecular com o BoHV-1 favorece a prevenção contra a MEH quando os bezerros recebem doses vacinais para o BoHV-1 antes do desmame (Stancioli, 2003).

Países como Dinamarca e Suíça, que anteriormente apresentavam baixa prevalência do BoHV-1 e que nunca permitiram o uso de vacinas, erradicaram a enfermidade com programas que utilizavam testes sorodiagnostics e eliminação dos animais reagentes (Ackermann et al., 1990; Van Oirschot, 1998). Contudo, em países com uma prevalência de moderada a elevada, a erradicação torna-se inviável pelo enorme custo envolvido com descartes. Rebanhos submetidos a vacinas vivas ou mortas não-deletadas impedem a diferenciação entre animais infectados e vacinados, enquanto que vacinas deletadas têm sido utilizadas com grande vantagem sobre as vacinas convencionais por permitirem essa diferenciação por meio de um teste ELISA. Este teste diagnostica anticorpos contra a glicoproteína que está presente somente no vírus de campo e não na cepa vacinal (Van Oirschot et al, 1996).

Em diversos trabalhos, o gene da timidina quinase – TK (enzima que fosforila a timidina às moléculas de DNA) é rotineiramente manipulado para gerar cepas mutantes a fim de se estudar alternativas vacinais contra as mais variadas

enfermidades herpéticas. Esses estudos apresentam conclusões promissoras para o desenvolvimento de vacinas contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (Zhang et al., 2011) e de agente vacinal heterólogo e homólogo de *Bovine herpesvirus 5* com o gene da TK deletado contra os *Bovine herpesvirus 1* e *Bovine herpesvírus 5*, respectivamente (Anziliero et al., 2011). Zhang et al. (2011) relataram que o mutante do gene TK deletado induz alto nível de interferon β no terceiro e quinto dias pós-infecção, além de prover longa proteção clínica contra o desafio com uma cepa de *Bovine herpesvirus 1* selvagem.

Quanto às perspectivas de tratamento, Brum (2006) confirmou os estudos de Serkedjieva & Ivancheva (1999), De Clerq (2000), Li et al. (2000) e Liu et al. (2005), ao sugerir que flavonóides, especificamente a quercetina, são potenciais candidatos à terapêutica medicamentosa e prevenção contra o BoHV-1 e BoHV-5 devido à sua ação antiviral, antioxidante e neuroprotetora.

A partir dessas informações, pode-se concluir que é a prevenção da instalação das infecções provocadas pelo BoHV-1 e BoHV-5 nos rebanhos a melhor maneira de contornar os prejuízos provocados por esse vírus, visto que não há vacinas que possam suprir qualitativamente a exigência da enfermidade. Além disso, atualmente, os potenciais antivirais continuam sob investigação e aguardam por sua implementação no mercado terapêutico.

2.4 Prenhez, imunodepressão animal e ativação viral

As alterações no eixo hormonal-reprodutivo devido às condições estressantes inerentes ao parto influenciam na imunodepressão da época gestacional, especificamente no parto (Soulsby, 1987). Nessa época, há aumento crescente dos níveis de glicocorticóides, visto que os mesmos apresentam importante função durante toda a lactação. Particularmente, o cortisol induz a diferenciação do retículo endoplasmático rugoso e do aparelho de Golgi na célula alveolar, participando no metabolismo de carboidratos e no balanço eletrolítico. Na presença da progesterona, os receptores dos glicocorticóides na glândula mamária se apresentam bloqueados. Conforme os níveis da progesterona diminuem, os corticóides passam a se ligar aos seus receptores e desenvolvem sua função (Collier et al., 1984). Contudo, o cortisol também tem o papel de deprimir o sistema imunológico, principalmente quando tem

sua produção estimulada por elementos estressantes, como estresse físico da periparturiente e nutrição desequilibrada (Carvalho et al., 2006). Daí a explicação da citação de Goff (2006), o qual afirma que cerca de 75% das enfermidades das vacas adultas ocorrem no primeiro mês pós-parto.

No mês anterior ao parto, a placenta é estimulada pelo cortisol liberado pelo feto a secretar o estrógeno, o qual substitui gradativamente a predominância da progesterona a fim de ativar o desenvolvimento da glândula mamária para a síntese do colostro e para preparar o organismo da vaca para o parto. O aumento da concentração de estrógeno e de prostaglandina requerida à luteólise também são diretamente relacionados ao desequilíbrio da função imunológica do organismo, visto que essa alteração hormonal brusca é uma condição que leva à liberação de cortisol em quantidades consideráveis (Carvalho et al., 2006). A isso, adiciona-se a transferência de imunoglobulinas corpóreas à glândula mamária a fim de que supra a formação de colostro ao recém-nascido (Dann et al., 1999), tornando a vaca ainda mais propensa a enfermidades em geral e à reativação de infecções latentes.

O estresse é uma condição intimamente ligada ao período do parto, visto que os mecanismos de defesa começam a decair em duas a três semanas pré-parto e alcançam o limiar mínimo até a segunda semana após a parição (Carvalho et al., 2006). Neutrófilos e linfócitos apresentam 50% de diminuição da sua atividade nos dias próximos ao parto (Kehrli et al., 1989).

Conforme Carvalho et al. (2006), a justificativa para tal imunodepressão é relacionada a eventos fisiológicos do parto, tais como colostrogênese, o próprio parto, balanço energético negativo, produção de radicais livres no pós-parto, rápido desenvolvimento fetal no terço final da gestação, manejo dado aos animais nessa fase, e aos eventos externos do calor, baixo conforto e precariedade nas instalações do estábulo.

Na ocorrência de prévia infecção aguda e posterior declínio da replicação viral, é induzida uma infecção latente pelos herpesvírus. Na latência, há presença do genoma viral em células semipermissivas, mais especificamente nos gânglios nervosos, principalmente no trigêmeo e sacral, sem produção de progênie viral (Engels & Ackermann, 1996). Nessa ocasião, repressores celulares são estimulados a bloquear a expressão dos genes alfa, cujos produtos são requeridos às etapas de expressão gênica e replicação genômica, interrompendo o ciclo lítico (Flores – org., 2007). Nos neurônios infectados, é produzido o transcrito relacionado à latência

(LTR - *latency related transcript*) (Henderson et al., 2004). O mesmo não é traduzido em proteína, mas tem a função de manter a latência ao controlar a expressão dos genes alfa (Tikoo et al., 1995), além de levar à reativação viral mediante situações específicas (Jones et al., 2006).

Quando o animal portador latente é exposto a fatores que predisõem ao estresse e que conseqüentemente diminuem a resistência imunológica (Ackermann et al., 1982), pode haver a recrudescência do agente de acordo com a redução da transcrição do LTR. A partir daí, haverá eliminação de partículas virais, na maioria das vezes sem apresentar sintomas clínicos (Lemaire et al., 1994). Um estudo demonstrou que a dexametasona, representando o cortisol em condições naturais, induz a ativação do fator de transcrição celular C/EBP- α (Workman et al., 2009). Este, através de interação em sítios específicos, estimula a expressão do gene viral que produz a proteína bICP0. Esta proteína está envolvida na expressão dos genes β , relacionados ao metabolismo de nucleotídeos e replicação do DNA viral (Geiser et al., 2005; Jones et al., 2006).

A bICP0 também está relacionada a mecanismos de escape imunológico viral. Henderson et al. (2005) demonstraram que a mesma inibe a transcrição do interferon tipo 1. De acordo com Saira & Jones (2006), essa inibição de sinalização antiviral inata é induzida pela degradação de IRF3 (fator de regulação 3 do interferon), uma proteína envolvida no complexo regulatório que garante a transcrição do interferon tipo 1.

2.5 Vias de eliminação viral e diagnóstico da presença viral através da reação da polimerase em cadeia (PCR)

Tanto na infecção aguda quanto na reativação da latência há excreção viral em secreções genitais e nasais. Contudo, a massa viral e o tempo em que é eliminada são maiores na primeira infecção quando comparados à segunda (Vogel et al., 2003 e 2004). O agente viral inicia sua replicação após 2 horas da infecção, expressa antígenos na superfície celular dentro de 3 a 4 horas e é eliminado e disseminado após 8 horas daquele início (Meurens et al., 2004; Babiuk et al., 1996).

Os herpesvírus apresentam tropismo pelos monócitos, macrófagos (Nyaga & McKercher, 1979; Forman et al., 1982) e linfócitos T CD4⁺ (Lovato et al., 2003), pois

os mesmos são algumas das células que produzem as proteínas necessárias à penetração e posterior produção viral (OGTR, 2005). A partir daí, sugere-se que esses microorganismos possam ser eliminados naturalmente por quaisquer vias de secreção corporal, como as já citadas secreções nasais e genitais e também via leite. Essa sugestão vem a partir de resultados de estudos de Probst et al. (1985), que relataram a excreção do BoHV-1 via leite em vacas experimentalmente infectadas. Como a composição sanguínea é diretamente relacionada àquela da secreção láctea, os leucócitos serão encontrados no leite (González, 2001) e, conseqüentemente, os agentes BoHV-1 e BoHV-5 em animais naturalmente infectados, fato este ainda não comprovado em literatura.

Com relação ao diagnóstico da presença viral, a investigação do material genético do agente nas amostras clínicas tem sido a forma mais eficaz para tal objetivo. O teste mais comumente utilizado vem sendo a reação da polimerase em cadeia (PCR), conforme os estudos de Wang et al. (2008), Campos et al. (2009) e Medina et al. (2009). A mesma tem se mostrado como uma técnica de melhor sensibilidade e especificidade quando comparada às tradicionais técnicas de isolamento viral, imunofluorescência e hibridização para o diagnóstico dos herpesvírus bovinos (Rocha et al., 1999; Moore et al., 2000).

Vários tipos de PCR vêm sendo desenvolvidos para aprimoramento do diagnóstico dos agentes em questão. Para amostras clínicas, foi desenvolvida a chamada *Nested-PCR*, a qual, por ser fundamentada em duas reações seguidas a partir de um fragmento de DNA molde, a torna mais sensível e específica do que a técnica convencional (Olmos et al., 2003). Botelho (2000), Diel et al. (2007) e Campos et al. (2009) padronizaram essa técnica com sucesso para a detecção de herpesvírus bovinos.

3. OBJETIVOS

1) Comparar a eliminação do BoHV-1 e/ou BoHV-5 em diferentes fases da lactação de vacas leiteiras naturalmente infectadas a fim de relacionar o estresse periparto com o aumento dessa eliminação;

2) Investigar a presença do DNA do BoHV-1 e/ou BoHV-5 no colostro e no leite;

3) Caracterizar a eliminação viral e a resposta sorológica em propriedades naturalmente infectadas utilizando *Nested-PCR* do leite e técnica de soroneutralização sanguínea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de execução do experimento

Todas as atividades de processamento das amostras foram realizadas nas dependências do Departamento de Veterinária, especificamente no Laboratório de Virologia Animal e no Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos, além do Laboratório de Infectologia Molecular Animal, localizado no Instituto de Pesquisa Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa.

4.2 Utilização de animais para experimentação

As normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV foram seguidas rigorosamente (número do protocolo do processo com parecer favorável a esta proposta experimental: 63/2010).

4.3 Propriedades e amostragem

O trabalho foi conduzido na região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, em seis propriedades leiteiras não-vacinadas contra o BoHV-1. Tais propriedades, localizadas na região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e pertencentes aos municípios de Cajuri (20° 46' 43" S e 42° 47' 51" W), Porto Firme (20° 38' 54" S e 43° 5' 18" W), São Geraldo – Distrito Monte Celeste (16° 40' 60" S e 44° 33' 0" W), Ervália (20° 50' 25" S e 42° 39' 8" W) e Piranga (20° 45' 45" S e 43° 18' 10" W), utilizam animais da raça holandesa em sua maioria e são assistidas pelo Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa (PDPL-RV).

As propriedades, e consequentemente o tamanho da população amostral, foram escolhidos considerando a maior facilidade de acesso e disponibilidade por parte dos proprietários.

De acordo com Medronho et al. (2009), a amostragem foi caracterizada como não-probabilística por conveniência, pois, além de não se dispor de uma lista de elementos certos da população, não houve delineamento de um plano específico de amostragem. O objetivo foi tomar a amostragem para, a partir da mesma, demonstrar as características principais de um grupo específico de estudo: caracterização da infecção e confirmação de uma secreção corpórea (leite) como via de eliminação dos herpesvírus bovinos aqui estudados.

A tabela 1 reúne a esquematização das coletas descritas a seguir.

Tabela 1. Propriedades amostradas, objetivo proposto para cada uma delas, localização, total de animais amostrados, tipos e totais de amostras coletadas de acordo com o objetivo proposto para cada propriedade e relacionado à detecção direta (presença do vírus na amostra) e indireta (resposta humoral) de BoHV-1 e/ou BoHV-5.

Propriedade	Objetivo	Cidades das propriedades amostradas	Nº vacas amostradas	Nº amostras coletadas		
				Sangue	Leite	Secreção nasal
A	Triagem	Cajuri (20° 46' 43" S e 42° 47' 51" W)	161	161	-	-
	Avaliação da fase do parto		23	23	23	23
	Avaliação da fase de 5 meses anteriores ao parto		25	25	21	25
B	Caracterização da eliminação viral via leite	Porto Firme (20° 38' 54" S e 43° 5' 18" W)	29	24	29	-
C	Caracterização da eliminação viral via leite	Monte Celeste/São Geraldo (16° 40' 60" S e 44° 33' 0" W)	39	39	39	-
D	Caracterização da eliminação viral via leite	Ervália (20° 50' 25" S e 42° 39' 8" W)	88	78	49	-
E	Caracterização da eliminação viral via leite	Piranga (20° 45' 45" S e 43° 18' 10" W)	83	53	66	-
F	Caracterização da eliminação viral via leite	Piranga (20° 45' 45" S e 43° 18' 10" W)	71	70	71	-

A coleta das amostras foi dividida em três frentes de trabalho:

1 - Para atender ao objetivo de estudar a interferência da imunodepressão ocorrente no periparto na eliminação viral de vacas leiteiras naturalmente infectadas (objetivo 1), a propriedade A foi utilizada. Inicialmente, todo o seu rebanho de vacas em lactação e secas (161 animais) foi submetido à coleta sanguínea a fim de separá-lo em animais positivos e negativos para os agentes em questão por meio de sorologia.

2 – Posteriormente e a fim de se alcançar os objetivos 1 e 2, 48 vacas foram selecionadas a partir daquelas que se mostraram positivas e que se adequavam às fases da lactação eleitas para este estudo. De acordo com a programação da época do parto, esses animais foram classificados em dois grupos diferentes: grupo 1 (cinco meses anteriores ao parto) e grupo 2 (até sete dias após o parto). Considera-se como periparto o período em torno do parto, englobando os sete dias após o mesmo, época esta em que ainda é secretado o colostro, segundo González (2001).

A partir daí, nas épocas especificadas, as vacas foram submetidas a novas coletas dos seguintes materiais orgânicos: sangue, colostro/leite e secreção nasal (Figura 2).

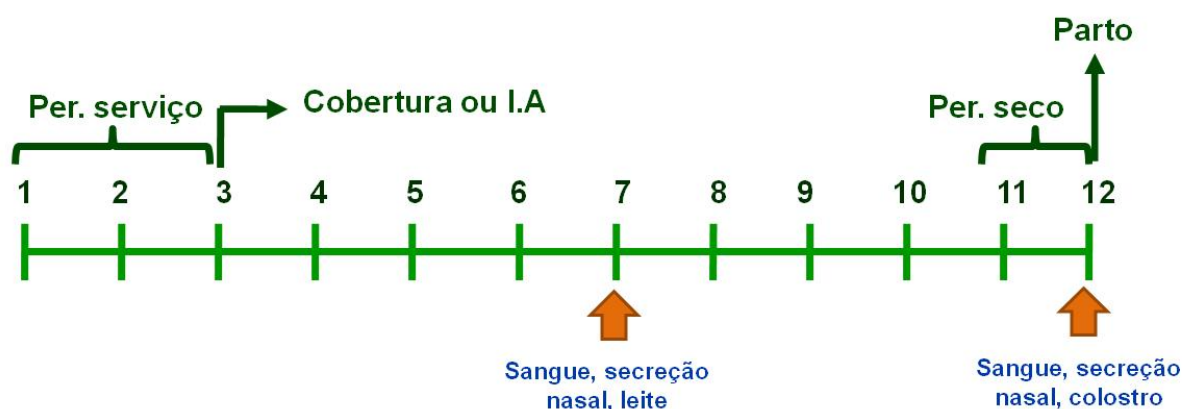


Figura 2. Ciclo anual de produção de um rebanho. Fases definidas para coleta: cinco meses anteriores ao parto e até sete dias pós-parto. I.A.: Inseminação artificial.

Coletou-se sangue mediante punção da veia coccígea em tubos a vácuo contendo solução do ácido etilenodiaminotetra-acético tripotássico (EDTA-K₃) a 10%

a fim de se obter leucócitos, e sem solução EDTA para obtenção do soro. As amostras foram processadas para posteriores testes de reação da polimerase em cadeia (leucócitos, colostro/leite e secreção nasal), sorologia e dosagem de cortisol (soro sanguíneo). Posteriormente, os dados de viremia, sorologia e eliminação viral de ambos os grupos foram confrontados, relacionando-os com os níveis de cortisol encontrados.

Com o propósito de confrontar as fases do ciclo produtivo das vacas, a época anterior ao parto de cinco meses foi eleita neste estudo. Nesse período, sugere-se que o animal não esteja sob modificações que causem imunodepressão tão intensa quanto no período do parto, apesar de sofrer alterações em seu organismo devido à prenhez.

3 – Por fim, de modo a caracterizar a eliminação viral através do leite em propriedades naturalmente infectadas (objetivo 3), outras cinco propriedades (B, C, D, E, F) tiveram as fêmeas bovinas adultas em lactação submetidas a coletas de leite e soro sanguíneo, sendo esse material submetido à PCR e à sorologia, respectivamente.

4.4 Sorologia

4.4.1 Células e vírus

Células de linhagem de rim bovino (MDBK- *Madin-Darby bovine kidney*) foram mantidas em garrafas de cultivo celular TPP® contendo “Minimum Essential Medium” Cultilab® (MEM) acrescido de estreptomicina (0,4 mg/L), penicilina (1,6 mg/L) e suplemento de soro fetal bovino (SFB - 5%) Cultilab® a 37 °C a uma atmosfera a 5% de CO₂. Os vírus utilizados foram as cepas BoHV-1-LA e BoHV-5-SV-507 (cepas cedidas pelo Dr. Rudi Weiblem/Laboratório de Virologia Animal/UFSM-RS).

4.4.2 Titulação viral

Para a realização da sorologia, é preciso que a cepa viral utilizada tenha seu título conhecido. Dessa forma, monocamadas de MDBK foram infectadas com suspensão da cepa viral submetida a uma sequência de 8 diluições na base 10 (10^{-1} a 10^{-8}). O procedimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 cavidades TPP® de acordo com o método de “Tissue Culture Infective Dose” (TCID₅₀). O título foi calculado de acordo com o método de Reed & Muench (1938) após 72 horas de incubação das placas em estufa com 5% de CO₂ e observação e leitura de efeito citopático em microscópio óptico invertido.

4.4.3 Avaliação de anticorpos

O teste de escolha para diagnóstico de anticorpos contra herpesvírus bovinos é a soroneutralização (SN), de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008). Para isso, coletaram-se 10 mL de sangue total sem anticoagulante a partir da veia coccígea dos animais.

O procedimento foi realizado em microplacas de 96 cavidades TPP®, sendo que a primeira coluna de cada microplaca foi constituída pelo controle de células, não recebendo soro e suspensão viral, a qual foi substituída por 100 µL de MEM livre de SFB. Já a primeira linha foi constituída pelo controle de toxicidade do soro. Essa linha recebeu suspensão celular e soro não-diluído. A diluição do soro suspeito foi realizada entre as linhas B e H da microplaca na base 2 crescente do soro (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). Dessa forma, cada amostra de soro foi equivalente a cada uma das colunas das placas, e cada diluição do soro ocupou uma linha da microplaca em ordem decrescente de concentração. Posteriormente às diluições, cada cavidade recebeu uma dose constante de vírus contendo 100 TCID₅₀/50 µL da cepa BoHV-1-LA, com exceção da coluna 1 e da linha 1. Após incubação da mistura soro-vírus por 1 hora a 37 °C em estufa de CO₂, uma suspensão de células MDBK de 50 µL na concentração de 300.000 células/mL foi adicionada, seguida de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C. A leitura dos testes foi realizada após 72 horas de incubação através do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados títulos de anticorpos neutralizantes as recíprocas das maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e, conseqüentemente, a produção de efeito

citopático. Amostras de referência positiva e negativa foram utilizadas como controle.

4.5 Medida dos níveis de cortisol no soro sanguíneo

Amostras de soro dos animais compreendidos nos grupos 1 e 2 foram analisadas quanto ao nível de cortisol sanguíneo. Para isso, foi realizado o ensaio Access Cortisol®, um imunoensaio quimiluminescente que determina quantitativamente os níveis do cortisol em soro utilizando os Sistemas de Imunoensaio Access®. Os procedimentos do ensaio foram realizados por um técnico especializado da empresa ScanLab Diagnóstica LTDA e o protocolo utilizado está de acordo as instruções do fabricante.

4.6 Avaliação da presença viral em amostras de colostro/leite, sangue e secreção nasal

4.6.1 Extração de DNA das amostras

As amostras de colostro/leite, sangue (leucócitos) e secreção nasal foram submetidas à extração do seu ácido nucléico total segundo adaptação das recomendações do fabricante do Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System - PROMEGA, U.S.A.

As alíquotas de colostro/leite foram submetidas a um pré-tratamento a fim de eliminar o excesso de lipídeos e outros sólidos existentes em suspensão na secreção láctea que inibem o sucesso da extração genômica, segundo Psifid et al. (2010). Fundamentalmente, o pré-tratamento consistiu de adição de solução tampão EDTA/Tris-HCl (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl – pH 7,6) e ETDA (0,5 M - pH 8) ao precipitado celular restante após descarte do sobrenadante isolado por centrifugação. Com relação às amostras de sangue, em uma etapa prévia e com o auxílio do reagente Ficoll-Paque Plus GE Healthcare®, de acordo com o protocolo do Retrolab – Escola de Veterinária UFMG – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (Série Protocolos Padronizados – 2006), foram extraídos os leucócitos do

sangue total. As amostras de DNA total foram armazenadas a – 20 °C até o momento da reação.

4.6.1.1 Obtenção do controle positivo para a reação da *Nested-PCR*

Para obtenção de amostra controle positivo, células MDBK com 24 horas de cultivo (5% SFB) foram infectadas com BoHV-1 e BoHV-5, separadamente. Após 24 horas de crescimento, previamente à observação do efeito citopático em microscópio, o sobrenadante de cada um dos cultivos foi descartado e a monocamada foi lisada com tripsina. A suspensão célula-tripsina foi colocada em microtubo de 1,5 mL, centrifugada a 15000 x g/1 minuto, sendo obtido um precipitado celular. O mesmo foi submetido à lavagem com 200 µL de PBS, pH 7,4, agitação intensa em vórtex e nova centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado, restando o precipitado, o qual foi submetido às recomendações do fabricante do Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System - PROMEGA, U.S.A para a extração do material genômico total utilizado como controles positivos de BoHV-1 e BoHV-5 da reação explicada a seguir.

4.6.2 Padronização da reação da polimerase em cadeia pela técnica de *Nested* (*Nested-PCR*)

Os DNA's do BoHV-1 e do BoHV-5, simultaneamente, foram amplificados mediante o uso dos oligonucleotídeos construídos a partir da região codificadora da glicoproteína B da cepa SV-507 de BoHV-5 (Tabela 2) previamente descritos por Diel et al. (2007).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na *Nested-PCR*

Oligonucleotídeo	Sequência	Localização no genoma
Externo senso (EF)	5'-CTCGAAAGCCGAGTACCTGCG-3'	57.338
Externo anti-senso (ER)	5'-CCAGTCCAGGCAACCGTCAC-3'	57.782
Interno senso (IF)	5'-GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC-3'	57.372
Interno anti-senso (IR)	5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3'	57.666

As reações foram montadas em microtubos de 200 µL, incluindo amostras e padrões. Como controle negativo, utilizou-se água ultra-pura estéril em substituição ao DNA molde. Quanto ao controle positivo, utilizou-se, como molde, 1 µL do DNA extraído de células infectadas com os BoHV-1 ou BoHV-5 deste estudo, em tubos separados.

Cada reação externa foi constituída de um volume final de 25µL, contendo 1 µL de DNA total de cada amostra, 2 µL de cada um dos oligonucleotídeos (20 pMol) EF e ER (Tabela 1), 2,5 µL de DMSO, 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix 2x Promega® e água ultra-pura (Millipore®), amplificando um fragmento de DNA de 444 pares de base (pb). A solução do Mix é composta pelo tampão de reação com a Taq® DNA polimerase 2x (pH 8,5), 400 µM dATP, 400 µM dTTP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP e 3 mM MgCl₂ (Promega®, USA).

Para a reação interna, os mesmos constituintes e quantidades de reagentes foram utilizados. Contudo, os oligonucleotídeos utilizados foram os IF e IR (Tabela 2) e os DNA's moldes de cada amostra e controle foram previamente diluídos em água ultra-pura estéril na proporção de 1:1500. Dessa diluição, retirou-se 1 µL para constituir o DNA molde da reação interna. Foi amplificado um fragmento de 295 pb.

As reações foram realizadas utilizando o equipamento Axygen® – Maxygene Termociclador com gradiente/Therm 1000. Para avaliação da temperatura ótima de anelamento dos oligonucleotídeos de ambas as reações aos DNA's de BoHV-1 e BoHV-5, realizou-se um gradiente de temperatura de 53 a 62 °C.

Tanto na reação externa quanto na interna, as seguintes condições de amplificação foram utilizadas: 5 minutos a 94 °C para desnaturação da dupla fita de DNA, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C (ativação da Taq® DNA polimerase), 1 minuto a 58,4°C (anelamento dos oligonucleotídeos às fitas desnaturadas de DNA) e 1 minuto a 72°C (extensão das fitas). Por fim, a reação foi submetida à 72°C/10 minutos (etapa final de extensão).

Para análise visual dos resultados, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Cinco microlitros de cada amostra foram homogeneizados com o intercalante e corante de DNA GelRed® diluído em água ultra-pura estéril (5:500). Essa mistura foi alocada em gel constituído por agarose 1% diluída em tampão TBE 0,5X (Tris 50 mM; Ácido bórico 45 mM; EDTA 0,5 mM – pH 8,3). Como padrão de tamanho molecular, utilizou-se DNA Ladder 100 pb (Promega®, USA). O gel de agarose contendo as amostras suspeitas, controles negativos, positivos e

padrão molecular foram submetidos a 100 volts constantes durante 45 minutos. A seguir, o mesmo foi avaliado sob luz ultravioleta e as fotografias de interesse foram registradas.

4.7 Análises estatísticas

Os dados referentes à sorologia e *Nested*-PCR de todas as amostras foram submetidos à análise do teste Qui-quadrado para comparação da frequência de positividade, e McNemar para aferir a coincidência entre os testes diagnósticos utilizados. Já os resultados da dosagem hormonal (cortisol) foram analisados segundo o teste de Mann-Whitney para a comparação de dois grupos independentes. As análises foram realizadas no Programa SAEG/UFV (1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização da *Nested-PCR*

Nas reações externa e interna, houve adequado anelamento de todos os oligonucleotídeos em toda a faixa de temperatura testada, considerando o BoHV-1 e o BoHV-5. As figuras 3a e 3b demonstram as diferentes temperaturas utilizadas nas reações internas da *Nested-PCR*, também considerando os DNA's amplificados do BoHV-1 e do BoHV-5 simultaneamente pelos mesmos pares de oligonucleotídeos. Dessa forma, optou-se pela temperatura de 58,4 °C, visto que é uma média do gradiente.

Inicialmente, Diel et al. (2007) desenharam as sequências dos oligonucleotídeos para a amplificação do DNA do BoHV-5. Contudo, mediante análises no presente estudo, foi verificado que os oligonucleotídeos utilizados amplificam tanto o BoHV-1 quanto o BoHV-5 (Figuras 3a e 3b). Para confirmação, foram realizados alinhamentos múltiplos pelo programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustal), em que foi verificada homologia completa dos oligonucleotídeos no gene da glicoproteína B (gB) em ambos os vírus (dados não mostrados).

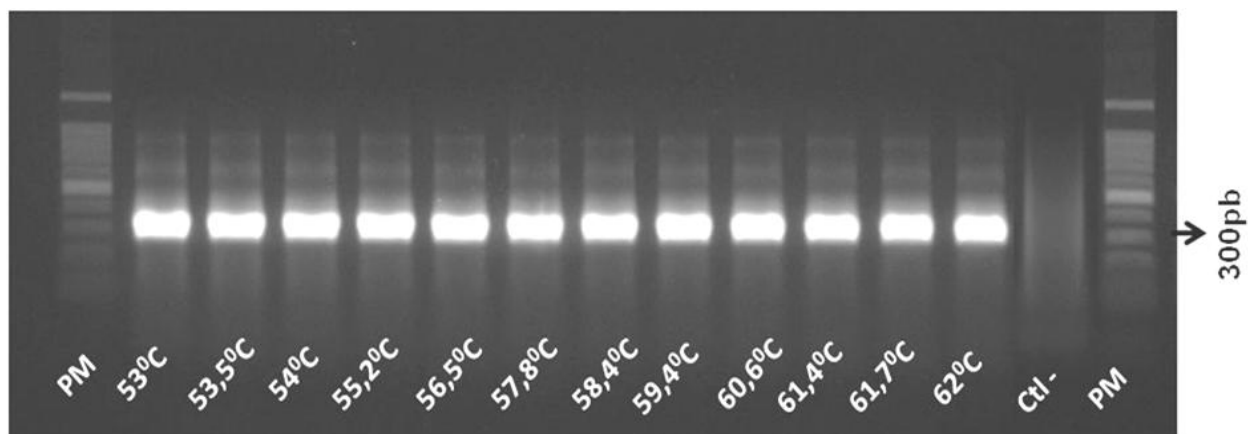


Figura 3a. Gel de agarose 1%. Produtos de amplificação no teste de gradiente da reação interna utilizando como molde o DNA do BoHV-1. Tamanho do fragmento amplificado: 295 pb. PM: padrão de tamanho molecular (100 pb); 53 a 62°C: gradiente de temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos; Ctl-: controle negativo.

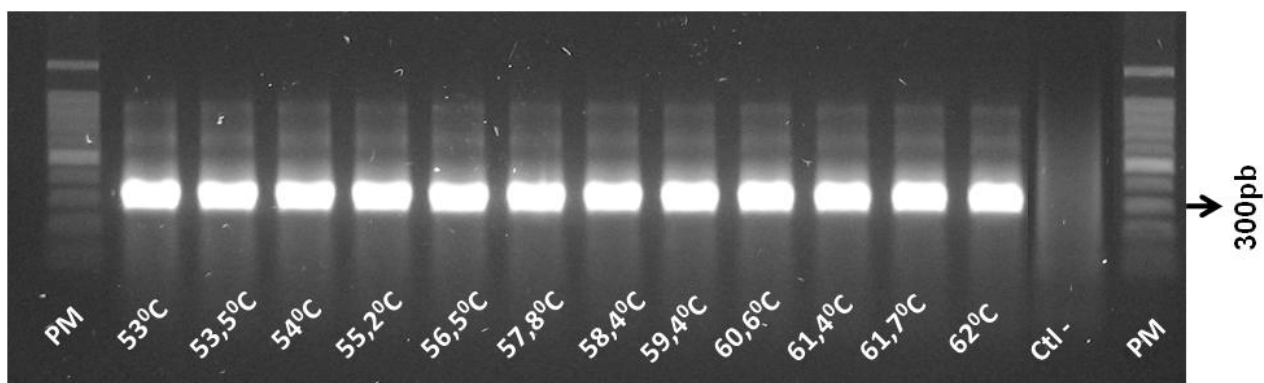


Figura 3b. Gel de agarose 1%. Produtos de amplificação no teste de gradiente da reação interna utilizando como molde o DNA do BoHV-5. Tamanho do fragmento amplificado: 295 pb. PM: padrão de tamanho molecular (100 pb); 53 a 62°C: gradiente de temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos; Ctl-: controle negativo.

5.2 Influência do cortisol na eliminação viral a partir de duas diferentes fases da prenhez

Os níveis de cortisol não se diferiram estatisticamente entre os grupos G₁ e G₂ (P>0,05) (Figura 4).

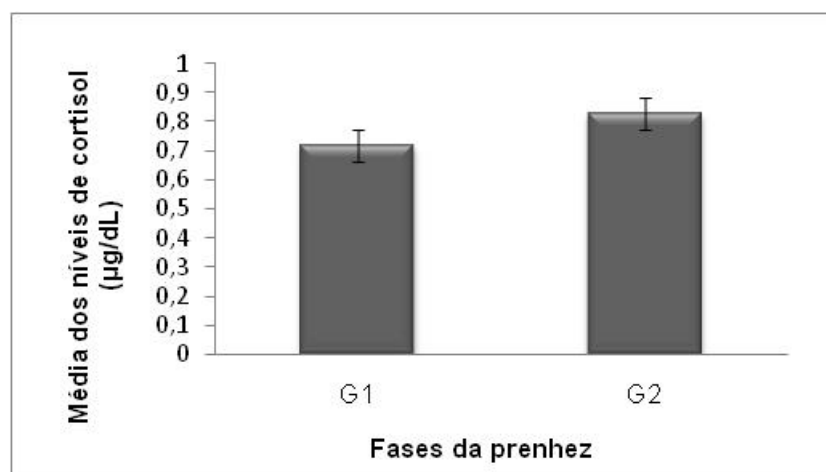


Figura 4. Dosagem de cortisol – Comparação entre os grupos G₁ (fase anterior ao parto - 5 meses anteriores) e G₂ (fase do parto - até 7 dias após) quanto aos níveis de cortisol. Parâmetro do cortisol em bovinos: 0,61 µg/dL (+/- 0,07) (Kaneko et al., 2008). As diferenças não foram significativas pelo método de Mann-Whitney (P>0,05).

Consequentemente, as frequências de positividade da sorologia, viremia e eliminação viral através de secreção nasal e leite entre os grupos também se apresentaram estatisticamente iguais (P>0,05) (Tabela 3 e Figura 5).

Tabela 3. Períodos da lactação avaliados através dos níveis de cortisol, sorologia e vias de eliminação viral. As amostras clínicas aqui analisadas foram aquelas da segunda coleta após a triagem. Parâmetro do cortisol em bovinos: 0,61 µg/dL (+/- 0,07) (Kaneko et al., 2008).

	Grupo 1					Grupo 2				
	C	SN	SG	SeN	LT	C	SN	SG	SeN	LT
N	25	25	25	25	21	23	23	23	23	23
Total de positivos	-	2	20	19	19	-	1	21	17	23
% positivos	-	8% ^a	80% ^b	76% ^c	90% ^d	-	4% ^a	91% ^b	74% ^c	100% ^d
M.C	0,72 ^e	-	-	-	-	0,83 ^e	-	-	-	-

Grupo 1: fase anterior ao parto (5 meses anteriores ao parto); grupo 2: fase do parto (até 7 dias após o parto); N: amostras coletadas; M.C: média da dosagem de cortisol; C: dosagem de cortisol (µg/dL); SN: Soroneutralização; SG: *Nested*-PCR leucócitos do sangue; SeN: *Nested*-PCR secreção nasal; LT: *Nested*-PCR leite. As diferenças entre a/a, b/b, c/c, d/d, e/e não foram significativas pelo método do Qui-quadrado (P>0,05).

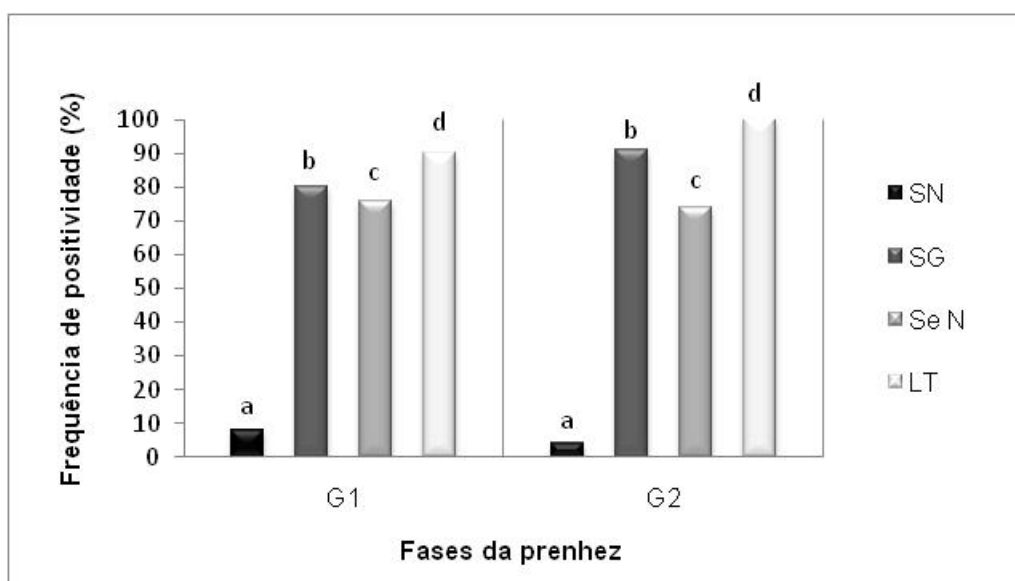


Figura 5. Frequência de positividade da amostragem coletada – Comparação entre as frequências de cada tipo de amostra nas duas fases da prenhez estudadas (G₁ - fase de cinco meses anteriores ao parto; G₂ - fase do parto). SN: resposta humoral obtida através da Soroneutralização; SG: leucócitos sanguíneos submetidos à *Nested-PCR*, remetendo-se à viremia; SeN: secreção nasal como via de eliminação viral e submetida à *Nested-PCR*; LT: leite como via de eliminação viral e submetido à *Nested-PCR*. As diferenças entre a/a, b/b, c/c, d/d não foram significativas pelo método do Qui-quadrado ($P>0,05$).

Contudo, comparando com o parâmetro de 0,61 µg/dL (+/- 0,07) indicado por Kaneko et al. (2008), os animais de ambos os grupos estudados apresentaram níveis elevados de cortisol sanguíneo. Isso leva à conclusão de que todo o rebanho analisado estava sob condição estressante, o que impossibilitou observação de diferenças nas frequências sorológicas, virêmicas e de eliminação viral em ambos os grupos de animais estudados.

As figuras 6 e 7 ilustram reações da PCR de algumas amostras coletadas nas duas fases da lactação estudadas.

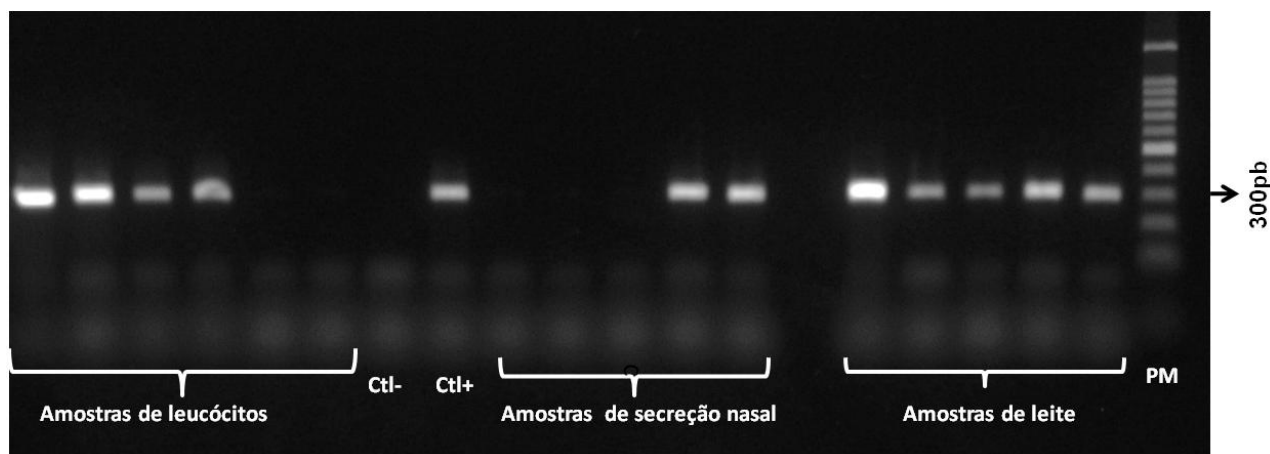


Figura 6. Gel de agarose 1%. Ilustração de produtos de amplificação do DNA viral (BoHV-1 e/ou BoHV-5) das reações internas de algumas amostras coletadas na fase do parto. Fragmento amplificado: 295 pb. Padrão molecular: 100 pb.

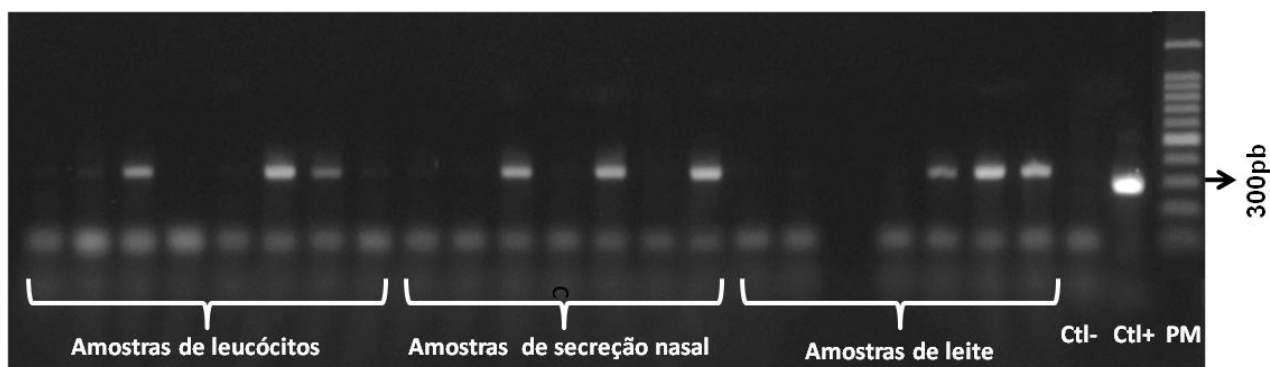


Figura 7. Gel de agarose 1%. Ilustração de produtos de amplificação do DNA viral (BoHV-1 e/ou BoHV-5) das reações internas de algumas amostras coletadas na fase de cinco meses anteriores ao parto. Fragmento amplificado: 295 pb. Padrão molecular: 100 pb.

5.3 Avaliação da eficiência do leite como alternativa de material para diagnóstico

5.3.1 Análise do leite como via de eliminação de BoHV-1 e/ou BoHV-5

De acordo com os resultados preliminares, observou-se eliminação de material genético de BoHV-1 e/ou BoHV-5 através de leite/colostró de animais naturalmente infectados. Conforme já explicitado, houve confirmação positiva, com alta frequência e sem diferenças estatísticas entre ambos os grupos representantes das diferentes

épocas da lactação: 90% de eliminação no grupo 1 (fase de cinco meses anteriores ao parto) e 100% no grupo 2 (fase do parto) (Tabela 3 e Figuras 5 e 8).

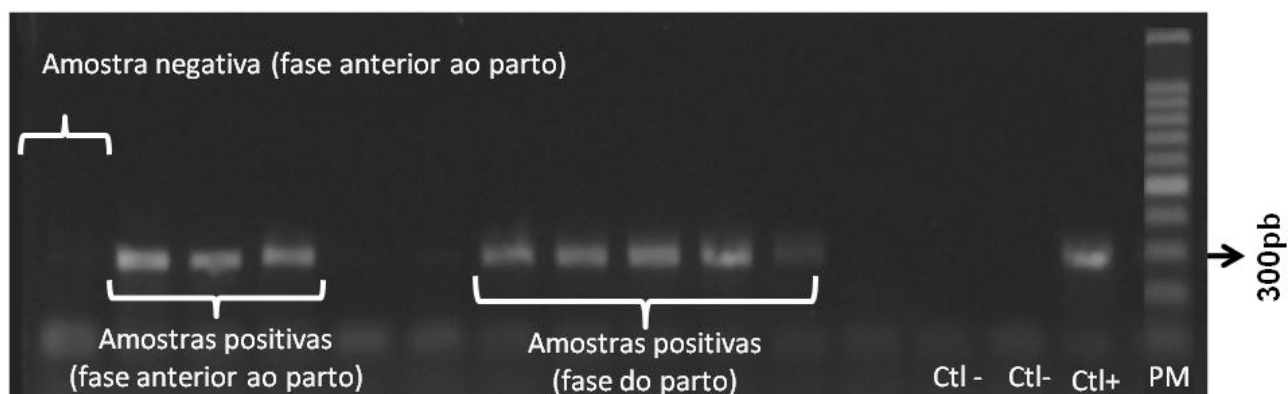


Figura 8. Ilustração de reação interna de algumas amostras de leite coletadas na fase do parto e em 5 meses pré-parto. Fragmento amplificado: 295 pb. P.M: Padrão molecular (100 pb).

Esse resultado complementa aquele de Probst et al. (1985), que detectaram eliminação viral através do leite em animais experimentalmente infectados.

Probst et al. (1985) demonstraram esse achado de forma indireta, pois sua conclusão foi que os bezerros sorologicamente negativos que receberam leite duas vezes por dia a partir das vacas infectadas com 10 mL de solução viral com título de $10^{4.5}$ TCID₅₀/mL intranasal também se mostraram infectados. Ainda foi realizada tentativa de isolamento viral a partir do leite em cultivo celular. Contudo, não houve sucesso. Após entrada em latência e posterior recrudescência, houve eliminação viral regular via nasofaringe e esporádica via leite e vagina, além de detecção no sangue. Isso, a partir de esfregaços. Além disso, foi fornecido leite contaminado artificialmente com BoHV-1 aos bezerros, os quais se tornaram infectados. Os títulos virais utilizados para contaminação do leite foram $10^{4.5}$, $10^{5.5}$ e $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL. Dependendo da quantidade de vírus no leite, os bezerros se tornaram clinicamente doentes ou apresentaram soroconversão na ausência de sinais clínicos. Em infecção generalizada, foi detectada eliminação viral via leite, enquanto que em infecção aguda, quantidades mínimas foram observadas. Sua conclusão foi que baixa quantidade de vírus no leite não foi o suficiente para definir uma infecção.

Alguns estudos relataram que o BoHV-1 pode estar envolvido, de forma direta ou indireta, na etiologia da mastite bovina. Não há confirmação de que cause a doença, mas há relatos de sua presença em lesões vesiculares de tetos e úbere de

animais com mastite, sem provas, contudo, de que seja o agente primário de tais lesões (Guy et al., 1984). Greig & Bannister (1965) relataram que o BoHV-1 provoca mastite clínica após inoculação intramamária. A partir daí, Straub & Kielwein (1966) evidenciaram os sinais clássicos da mastite clínica, tais como aumento da temperatura corpórea, diminuição do apetite, inflamação e edema do úbere e grande redução da produção de leite. Também foi observada morfologia anormal de amostras de leite após inoculação de uma cepa de BoHV-1, apresentando coágulos e sangue (Greig & Bannister, 1965).

Além disso, Gourlay et al. (1974), Roberts et al. (1974) e Wayne & Carter (1974) isolaram o vírus da IBR do leite de animais com mastite clínica em casos naturais de origem desconhecida. O BoHV-1 também já foi isolado a partir de leite de vacas com mastite em combinação com *Mycoplasma agalactiae* (Espinasse et al., 1974; Gourlay et al., 1974) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) (Siegler et al., 1984). Diferentemente, Wellenberg et al. (2000) não isolaram BoHV-1 a partir de amostras de cinquenta e oito casos naturais de mastite clínica de dez rebanhos examinados virologicamente.

Quanto ao BoHV-5, não há relatos acerca da sua relação com mastite bovina ou, ainda, da sua eliminação através do leite.

Os animais do presente estudo não apresentaram manifestações características da mastite clínica (dados não mostrados), relatados anteriormente. O objetivo aqui foi investigar a eliminação dos BoHV-1 e BoHV-5 em leite, sem associação a enfermidades clinicamente aparentes, a fim de propôr um novo material como amostra para diagnóstico da IBR e da MEH.

Neste estudo, foi detectado material genético dos BoHV's focados, não se remetendo necessariamente a partículas infecciosas. Ainda que resultado positivo em PCR de determinada amostra sugira ocorrência de material infeccioso, para provar que o mesmo se encontra em secreção láctea, indica-se realizar isolamento viral.

Visto que o colostro é altamente rico em anticorpos e células de defesa (células B, células T CD, macrófagos e neutrófilos) (Cortese, 2011) pelas quais o BoHV-1 e o BoHV-5 apresentam tropismo, é sensato concordar com a eliminação viral através da secreção láctea. Embora tenha sido comprovada a eliminação do material genético dos agentes em questão via leite neste estudo, ainda se torna necessário averiguar quantitativamente a fim de que se saiba se a carga viral eliminada é capaz

de transmitir a infecção. Esse objetivo pode ser alcançado mediante análises de reação da polimerase em cadeia em tempo real e/ou isolamento viral e titulação.

5.3.2 Confronto entre eliminação viral via leite, secreção nasal, viremia e sorologia

Como não foram apresentadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos níveis de cortisol, sorologia, viremia e vias de eliminação viral, as próximas análises foram realizadas mediante comparação das frequências de positividade entre aquelas variáveis dentro dos grupos para avaliação do leite como amostra alternativa para diagnóstico viral. Dessa forma, o total de cada tipo de amostra de ambas as fases da lactação foi agrupado.

5.3.2.1 Eliminação viral via leite e secreção nasal x Sorologia

Comparando a eliminação via leite e secreção nasal à sorologia de ambos os grupos, houve frequência estatisticamente superior de positividade pelas duas vias de eliminação ($P < 0,05$) (Figura 9). Esse resultado está de acordo com os argumentos de Huck et al. (1971), Parsonson & Snowdon (1975), Kupferschimid et al. (1986), Xia et al. (1995) e Gee et al. (1996), os quais explicam que não necessariamente há correlação obrigatória entre a presença de infecção pelo BoHV-1 e, conseqüentemente, pelo BoHV-5, e a detecção de anticorpos específicos circulantes.

Essa afirmação se baseia na confirmação por esses autores da detecção do BoHV-1 em amostras clínicas obtidas de animais soronegativos. Segundo Kupferschimid et al. (1986), é possível que vacas sejam contaminadas via inseminação artificial com sêmen infectado pelo vírus e proveniente de touro soronegativo. Da mesma forma e de acordo com os achados de Snowdon (1965) e Van Der Engelenburg et al. (1995), em animais clinicamente saudáveis, mas que apresentam reativação viral, pode haver infecções leves ou subclínicas concomitantemente à eliminação de grandes quantidades de vírus no sêmen.

Estudando eliminação de BoHV-1 via sêmen, Schultz et al. (1976) propuseram três possibilidades que fazem com que o vírus possa ser diagnosticado na referida

secreção orgânica de touros soronegativos. Essa interpretação pode ser extrapolada para os resultados das secreções em foco do presente estudo, visto que todas são fluidos oriundos do organismo bovino. Conforme os autores, animais susceptíveis com infecção ativa podem excretar o vírus antes do desenvolvimento de anticorpos. Além disso, o teste sorológico padrão utilizado (soroneutralização) apresenta baixa sensibilidade em detectar níveis reduzidos de anticorpos, principalmente quando a reativação da infecção latente está no início. Por fim, há possibilidade de que alguns animais infectados desenvolvam imunidade celular sem resposta humoral mensurável. Sendo assim, apesar de ser um importante método para detecção de infecções herpéticas, a pesquisa de anticorpos apresenta falhas na determinação da presença de BoHV-1 (Rocha et al., 1999) e, conseqüentemente, de BoHV-5. É importante lembrar que os anticorpos produzidos não se diferem quanto à antigenicidade de BoHV-1 e BoHV-5, visto que são molecularmente semelhantes (Flores – org., 2007).

Em nenhum momento da descrição do presente estudo, os títulos sorológicos foram avaliados porque não houve resultado amostral suficiente para análise estatística (dados não mostrados).

5.3.2.2 Eliminação viral via leite x Via secreção nasal

A eliminação via leite apresentou maior frequência que via secreção nasal ($P < 0,05$) (Figura 9), fato este que pode ser explicado devido ao tempo limite de excreção viral via nasal após início da infecção. De acordo com Cadore et al. (2011), há eliminação viral nas secreções nasais até o 7º dia pós-inoculação durante a infecção aguda. Belák et al. (1999) demonstraram irregularidade e inconsistência nessa via de eliminação entre os animais durante 3 a 10 dias pós-inoculação viral. Além disso, a atividade neutralizante da imunoglobulina A, detectada em secreções nasais entre o 4º e o 30º dia pós-infecção (Wyler et al., 1989), também pode diminuir a detecção dos BoHV's focados. Dessa forma, há suposta concordância entre esses resultados e os deste estudo, pois pode ter havido início da infecção produtiva em época distante daquele dia de coleta das amostras. Pode-se sugerir que o tempo de excreção viral via leite seja maior que via secreção nasal. Para isso, são necessários maiores estudos em relação à eliminação viral via leite.

5.3.2.3 Eliminação viral via leite x Viremia

A frequência de eliminação via leite se apresentou tão alta quanto os níveis virêmicos ($P>0,05$) (Figura 9). Isto, devido à íntima relação entre esses fluidos. A demanda para a formação de 1 litro de leite em vacas é da ordem de 450 litros de sangue (González, 2001). Dessa forma, os constituintes do sangue acabam por fazer parte da formação do leite, estando entre eles água, sacarídeos, lipídeos, proteínas, minerais, vitaminas, enzimas e células somáticas. Estas, em sua maioria, são os leucócitos, os quais migram para a glândula mamária a fim de combater agentes agressores (Pereira et al., 2001), mas também podem ser carreadores do vírus ao local. Lembrando que os BoHV's apresentam tropismo por tais células, esse conjunto de informações fundamenta os níveis equiparados de positividade na análise de leite e de leucócitos sanguíneos, visto que essas células se apresentam tanto em leite quanto em sangue.

5.3.2.4 Viremia x Sorologia

Houve maior frequência de positividade da viremia que da sorologia na segunda fase de coleta ($P<0,05$) (Figura 9). Ou seja, dos 161 animais submetidos à primeira coleta sanguínea para triagem, somente 48 se apresentaram positivos e se adequaram às fases eleitas para segunda coleta a fim de analisar as vias de eliminação viral. Contudo, as amostras dessa coleta posterior, em ambas as fases de lactação estudadas, mostraram considerável negatividade nas frequências de anticorpos (96% na fase do parto e 92% antes do parto, sem, portanto, diferença estatística – $P>0,05$) e alta frequência virêmica. Sugere-se que esse ocorrido se deva ao alto nível de cortisol observado, favorecendo diminuição da resposta humoral e promovendo maior atividade viral.

5.3.2.5 Viremia x Eliminação viral via secreção nasal

Também foi observado que a frequência virêmica igualou-se estatisticamente àquela da secreção nasal ($P>0,05$) (Figura 9). Esse resultado pode estar relacionado àquele explicado anteriormente: com a recrudescência da infecção latente, é possível nova replicação viral na mucosa respiratória. Também pode ter havido infecção primária.

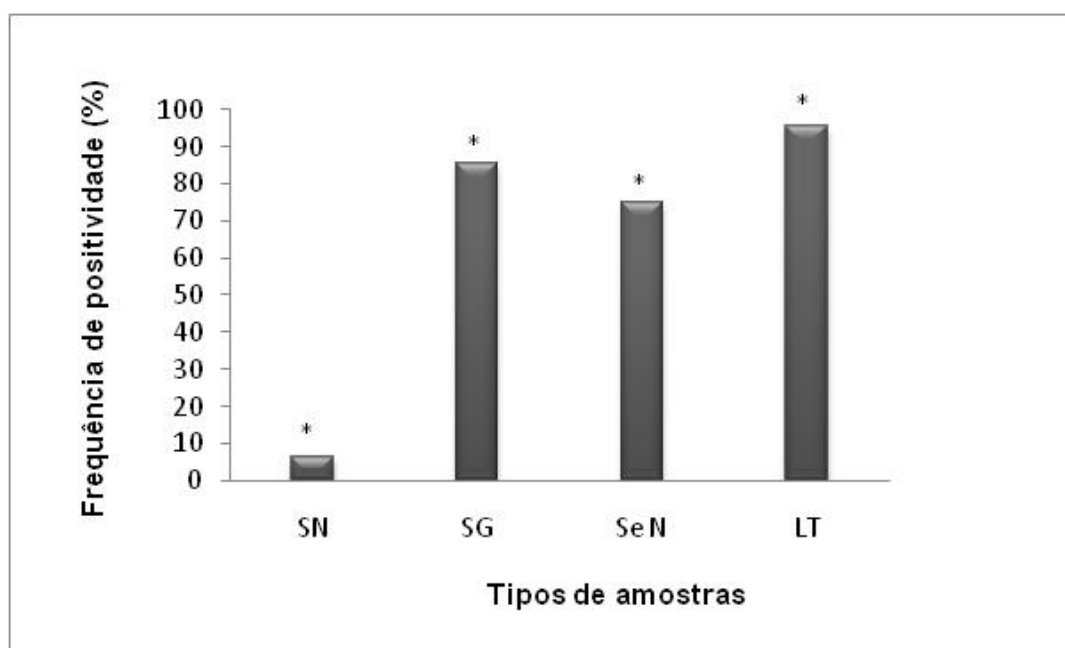


Figura 9. Comparação entre resposta humoral, viremia e eliminação viral através de secreção nasal e leite. SN: resposta humoral verificada por Soroneutralização; SG: viremia verificada por *Nested-PCR* de leucócitos sanguíneos; SeN: eliminação viral através de secreção nasal verificada por *Nested-PCR*; LT: eliminação viral através de leite verificada por *Nested-PCR*. (*): Houve diferença estatística pelo método do Qui-quadrado ($P<0,05$) entre: SN/SG; SN/SeN; SN/LT; SeN/LT.

5.4 Caracterização da eliminação viral via leite em diferentes propriedades naturalmente infectadas

A partir da conclusão de que o leite é uma amostra bem utilizável para a detecção da eliminação do material genético dos agentes virais, buscou-se caracterizar essa eliminação em diferentes propriedades da Zona da Mata Mineira a partir de sorologia sanguínea e *Nested-PCR* de leite.

As propriedades B, C, D, E e F foram submetidas a coletas sanguíneas e de leite em época não especificada do ciclo de produção animal, visto que o objetivo aqui foi demonstrar a frequência de animais positivos em relação à eliminação viral através de uma via em particular.

Dentre todos os animais submetidos ao estudo, 49% apresentaram anticorpos contra o BoHV-1 e/ou BoHV-5, enquanto 52% deles estavam eliminando material viral através do leite (Tabela 4). O resultado sorológico apresentado confirma, mais uma vez, a ampla circulação do(s) agente(s) viral(is) nos rebanhos leiteiros.

Tabela 4 – Propriedades leiteiras cujas vacas foram submetidas às coletas de sangue e leite e suas respectivas frequências de positividade quanto ao BoHV-1 e/ou BoHV-5.

	Propriedade B		Propriedade C		Propriedade D		Propriedade E*		Propriedade F*		Todas as propriedades	
	SN	N-PCR	SN	N-PCR	SN	N-PCR	SN	N-PCR	SN	N-PCR	SN	N-PCR
N coletado	24	29	39	39	78	49	53	66	70	71	264	254
Total de positivos	13	11	9	16	37	24	24	50	47	30	130	131
% positivos	54	38	23	41	47	49	45	76	67	42	49	52

N coletado: Total de amostras coletadas. SN: Soroneutralização; N-PCR: *Nested*-PCR leite.

(*): Propriedades que apresentaram diferença estatística entre os testes utilizados pelo método do Qui-quadrado ($P < 0,01$).

Para confrontar resultados de eliminação viral e resposta humoral, as propriedades foram analisadas separadamente, pois cada uma possui condições próprias de manejo animal que influenciam diretamente nas condições de bem-estar e conforto. Como já mencionado, essas condições se relacionam intimamente às enfermidades provocadas pelos herpesvírus bovinos.

Três propriedades desta fase experimental (B, C, D) não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,01$) entre suas frequências de positividade de anticorpos anti-BoHV-1/5 e presença de material genético no leite (Tabela 4). A época de infecção não foi detalhadamente monitorada. Porém, nas propriedades B, C e D, a época de coleta pode ter coincidido com os momentos de eliminação e soroconversão. Dessa forma, é plausível concordar que a época de infecção viral influi fortemente na resposta do organismo animal. Adicionalmente, pode-se sugerir que esses rebanhos não estavam sob condições estressantes, embora o nível de

cortisol não tenha sido mensurado. Um indicativo de estresse poderia ser a baixa ocorrência de anticorpos neutralizantes em relação à frequência de eliminação viral, o que não foi observado estatisticamente.

Nas propriedades E e F, houve consideráveis diferenças de positividade entre os parâmetros avaliados ($P < 0,01$) (Tabela 4). Na primeira, a eliminação viral via leite foi mais frequente, o que pode estar relacionado a um início de quadro infeccioso agudo ou a uma possível reativação de infecção latente, momento no qual a soroconversão ainda não ocorreu. Esse resultado está de acordo com Hage et al. (1996), os quais relatam que o período infeccioso em animais soropositivos reinfetados (ou seja, que saíram da infecção latente) pode chegar até sete dias, encontrando títulos virais acima de $10^{1,5}$ TCID₅₀/mL. Essa ocasião pode se iniciar em oito dias anteriores ao aumento significativo do título de anticorpos. Ainda segundo Bitsch (1978) e Pastoret et al. (1984), a disseminação viral pode ou não estar acompanhada de sinais clínicos. Também é possível sugerir que esse rebanho estava sob algum tipo de estresse, favorecendo menor frequência de anticorpos anti-BoHV-1/5 e maior ocorrência de eliminação viral.

Já na propriedade F, os animais apresentaram resposta humoral mais ativa. Nesse caso, sugere-se um início de infecção subclínica, onde o vírus é levado ao estado latente sem que a frequência de anticorpos decaia o suficiente. Desse modo, a presença dos anticorpos ainda pode ser perceptível pelo teste da soroneutralização (Tabela 4). Também é sugerido que uma parte dos animais esteja sob infecção latente, e outra parte, sob infecção produtiva.

A partir de todas as análises aqui realizadas, observa-se que o leite é uma amostra indicada para diagnóstico quando a infecção dos animais é apresentada na forma produtiva, mas não quando na infecção latente. Dessa forma, testes sorológicos complementares devem ser realizados. A exemplo do presente trabalho, a soroneutralização e a PCR podem ser associadas a fim de se obter um diagnóstico mais conclusivo da infecção pelos herpesvírus bovinos focados.

6. CONCLUSÕES

- Não foi verificada diferença entre os níveis de cortisol na fase periparto quando comparada à fase de cinco meses anteriores ao parto na propriedade estudada. Contudo, esses níveis se apresentaram elevados quando confrontados com referência de literatura, indicando ocorrência de condição estressante nos animais da propriedade focada;
- Não houve diferenças de frequência de positividade na detecção do genoma viral e na resposta humoral, considerando as duas fases da lactação estudadas daquele rebanho particular. Contudo, relacionando o resultado sorológico ao parâmetro cortisol (referência da ocorrência de situação estressante do rebanho analisado), houve frequência de anticorpos abaixo do nível;
- O leite se mostrou como uma alternativa amostral para diagnóstico da presença do genoma do BoHV-1 e/ou do BoHV-5 na fase de infecção produtiva, visto que é mais fácil coletá-lo, comparando à coleta de sangue;
- Os resultados encontrados foram de grande importância para esclarecer dados da patogenia do BoHV-1 e/ou BoHV-5 dentro de rebanhos bovinos leiteiros.

7. PERSPECTIVAS

No presente estudo, foi confirmada a eliminação de DNA dos vírus em questão através do leite. Contudo, é necessário dar continuidade a este estudo a fim de avaliar a existência de transmissão via leite vinculada à eliminação. A reação da polimerase em cadeia em tempo real é um método que pode esclarecer essa questão, visto que a partir da mesma pode-se ter informações acerca da carga viral eliminada, diferentemente do teste da *Nested-PCR*, o qual é um ensaio qualitativo. Além disso, uma vez demonstrada a carga viral, é provável que possa ser esclarecida a hipótese de que os BoHV-1 e/ou BoHV-5 são eliminados em maior quantidade próximo ao parto.

A padronização da PCR em tempo real foi iniciada concomitantemente neste estudo e ainda busca-se aplicá-la no material aqui apresentado. Isso, a fim de esclarecer mais uma questão relacionada aos herpesvírus bovinos.

A partir do esclarecimento de dados da patogenia dos agentes virais aqui estudados, é possível rever as condições de manejo atualmente adotadas na bovinocultura leiteira e sugerir medidas de melhoria.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginites virus infection diagnosis and control. *Veterinary Microbiology*, v.23, p. 361-363, 1990.
- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra- IBR eradication. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p. 293-302, 2005.
- ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of the bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, p. 36-40, 1982.
- AL-KATANANI, Y.M., PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 390–396, 2002.
- ALLAN, P. J.; DENNETT, D. P.; JOHNSON, R. H. Studies on the effects of infectious bovine rhinotracheitis virus reproduction in heifers. *Australian Veterinary Journal*, v. 51, p. 370-373, 1975.
- ANDRADE, G.I. Diagnóstico sorológico de herpesvírus bovino 1 e 5: proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície. Tese de doutorado - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2006.
- ANZILIERO, D.; SANTOS, C.M.B.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; CHOWDHURY, S.I.; FLORES, E.F. 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. *Veterinary Microbiology*, v. 154, p.14-22, 2011.
- BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*, v. 53, p. 31-42p, 1996.
- BAGUST, T.J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *Journal of Comparative Pathology*, v. 82, p. 375–383, 1972.
- BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, v. 6, p.1368-1373, 2005.
- BARTHA, A.; HADJDU G.; ALDASY P.; PACZOLAY G. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in

Hungary. Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae, v. 19, p. 145-151, 1969.

- BELÁK L.; KUCSERA C.; ROS G.; KULCSÁR L.; MAKRANSZKI T.S.; BELÁK S. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, v. 22, p. 207-220, 1999.
- BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. Journal of Animal Science, v. 73, p. 2804–2819, 1995.
- BITSCH, V. Persistence of infection with infectious tracheitis virus in Danish cattle herds. Nordic Veterinary Medicine, v. 30, p. 178–185, 1978.
- BOTELHO, R. G. A. Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- BRAKE, F.; STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. Australian Veterinary Journal, v. 62, p. 331–334, 1985.
- BRUM, L. P. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácido ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (quercetina e kaempferol) sobre os Herpesvírus bovino 1, Herpesvírus bovino 5 e Vírus da Cinomose Canina (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- CADORE, G. C.; ANZILIERO, D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 31, p. 1090-1096, 2011.
- CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HUBNER, S. O.; OLIVEIRA, M. T.; SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F. A. M. High prevalence of co-infections with *bovine herpesvirus* 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. Veterinary Microbiology, v.139, p. 67-73, 2009.
- CANANT, J.C. Diagnosis of the cause bovine abortion, part 1. Modern Veterinary Practice, v. 1, p. 929-931, 1984.
- CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A. A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, v. 30, p. 327–332, 1983.
- CARVALHO, A. U.; GESTEIRA, S.; SERRANO, A. L. Alterações metabólicas no parto. Artigos técnicos ReHagro, 2006. Disponível em:

<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1359>. Acesso em 03 jan. 2012.

- COLLIER, R. J.; MCNAMARA, J. P.; WALLACE, C. R.; DEHOFF, M. H. A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *Journal Animal Science*, v. 59, p. 498-510, 1984.
- COLODEL, E.M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 32, p. 293-298, 2002.
- CORTESE, V. Immunology and Vaccination of Dairy Cattle. *In: Dairy Production Medicine*, p. 165-173. Editado por Carlos A. Risco e Pedro Melendez. Wiley-Blackwell, USA, 365pgs, 2011.
- D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; ROBERT, W.; FULTON, D.V.M. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, p. 534-539, 1993.
- DANN, H.M.; VARGA, G.A.; PUTNAM, D.E. Improving energy supply to late gestation and early postpartum dairy cows. *Journal of Veterinary Research*, v. 82, p. 1765-1778, 1999.
- DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 86, p. 69-88, 2002.
- DE CLERQ, E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medical Care Research and Review*, v. 20, p. 329-349, 2000.
- DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D' ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. *Cominuolls Educacion Journal*, São Paulo, v. 5, p.300, 2002.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Review: Biology of bovine herpesvirus 5. *The Veterinary Journal*, v. 184, p. 138-145, 2010.
- DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z.; AFONSON, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genome of bovine herpesvirus 5. *Journal of Virology*, v. 77, p. 10339-10347, 2003.
- DIAS, J. A.; ALFIERI, A.A.; MEDICI, K.C.; FREITAS, J.C.; FERREIRA-NETO, J.S.; MÜLLER, E.E. Fatores de risco para infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos na região oeste do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, p.161-168, 2008.

- DIEL, D. G.; ALMEIDA, S. R.; BRUM, M. C. S.; DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*, v. 121, p. 257-267, 2007.
- DIEL, D. G.; FONSECA, E. T.; SOUZA, S. F.; MAZZANTI, A.; BAUERMANN, F.; WEIBLE, R.; FLORES, E. F. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigemial para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p. 164-170, 2005.
- DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *The Canadian Veterinary Journal*, v.31, p. 815-820, 1990.
- ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, p. 123-131, 2004.
- EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Disponível em http://www.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=178:-custo-de-producao-da-atividade-leiteira&catid=19:cursos-treinamentos&Itemid=26. Acesso em: 16 dez. 2011.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, v.53, p. 3-15, 1996.
- ESPINASSE, J.; GILBERT, Y.; SAURAT, P. Features of bovine rhinotracheitis in a dairy herd in south-western France. *Revue de Médecine. Vétérinaire*, v.125, p. 1441-1452, 1974.
- FERIN, M. Stress and the Reproductive System. *In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Chapter 48. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, p.2627-2696, 2006.
- FIELD, H.J.; BISWAS, S.; MOHAMMAD, I.T. Herpesvirus latency and therapy from a veterinary perspective. *Antiviral Research*, v. 71, p.127-133, 2006.
- FIGUEIREDO, L. A. Presença do genoma de Herpesvírus bovino 5 e do Herpesvírus bovino 1 no SNC de bovinos sadios, portadores de meningoencefalite herpética e outras encefalopatias. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2009.
- FLORES, E. F. (org.). *Herpesviridae*. In: *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, p. 454-457, 2007.

- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p.125-134, 2005.
- FORMAN, A. J.; BABIUK, L. A.; MISRA, V.; BALDWIN, F. Susceptibility of bovine macrophages to infections bovine rhinotracheitis virus infection. *Infection and Immunity*, v. 35, p. 1048-1057, 1982.
- FRANKLIN, S. T.; YOUNG, J. W.; NONNECKE, B. J. Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 2507-2514, 1991.
- FRENCH, A.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Australian Veterinary Journal*, v. 38, p. 216–221, 1962.
- GARDINER, M. R.; NAIRN, M. E.; SIER, M. Viral meningoencephalitis of calves in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 40, p. 225-228, 1964.
- GEE, A. L. W.; WATGER, L. H. A.; HAGE, J. J. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, v. 53, p. 163-168, 1996.
- GEISER, V.; ZHANG, Y.; JONES, C. Analysis of a bovine herpesvirus 1 recombinant virus that does not express the bICP0 protein. *Journal of General Virology*, v. 86, p. 1987-1996, 2005.
- GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *The Veterinary Bulletin*, v. 47, p. 317-343, 1977.
- GOFF, J. P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 11291–11301, 2006.
- GONÇALVES, E. Vilgon Consultoria e Projetos Agropecuários. Guia Prático de Produção Intensiva de Leite – Série “Gestão e Qualidade”, SEBRAE-RJ/SENAR-RIO/FAERJ, 32p., 2008.
- GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Edição por González, F. H. D.; Durr, J. W.; Fontaneli, R. S. Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, Porto Alegre – RS. 77pgs, 2001.
- GONZÁLEZ, H.E. Evaluación de la presencia de los virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y Diarrea Viril Bovina (DVB) en el sistema reproductor de vacas enfermas. *PANVET: Panamerican Association of Veterinary Sciences*, v. 260, 1996.
- GOUGH, A.; JAMES, D. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis. *Veterinary Journal*, v. 16, p. 313-314, 1975.

- GOURLAY, R. N.; ESPINASSE, J.; BARLE, C. Isolation of mycoplasma agalactiae varo bovis and infectious bovine rhinotracheitis virus from an outbreak of mastitis in France. Veterinary Record, v. 95, p. 534-535, 1974.
- GRANT, R.J.; ALBRIGHT, J.L. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. Journal of Animal Science, v. 73, p. 2791–2803, 1995.
- GREIG, A. S.; BANNISTER, G. L. Infection of the bovine Udder with Bovine Herpes Virus. Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science, v. 29, p. 57-62, 1965.
- GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. Journal of Animal Science, v. 73, p. 2820-2833, 1995.
- GUY, J. S.; POTGIETER, N. D.; MCCRACKEN, M.; MARTIN, W. Isolation of bovine herpesvirus-1 from vesicular lesions of bovine udder. American Journal of Veterinary Research, v. 45, p. 783–785, 1984.
- GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; KIDDY, C. A.; PAPE, M. J.; WILCOX, C. J. Hormonal pattern during heat stress following PGF2 α -tham salt induced luteal regression in heifers. Theriogenology, v. 16, p. 271–285, 1981.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Hormônios, Fatores de crescimento e Reprodução. In: Reprodução Animal. Ed. Manole, SP, p.33-53, 2004.
- HAGE, J. J.; SCHUKKEN, Y. H.; BARKEMA, H. W.; BENEDICTUS, G.; RIJSEWIJK, F. A. M.; WENTINK, G. H. Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. Veterinary Microbiology, v. 53, p. 169-180, 1996.
- HANSEN, P. J. Strategies for enhancing reproduction of lactating dairy cows exposed to heat stress. In: Proceedings of the 16th Annual Convention American Embryo Transfer Association, Madison, p. 62–72, 1997.
- HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. Journal of Animal Science, v. 80, p. 33–44, 2002.
- HENDERSON, G.; ZHANG, Y.; JONES, C. The Bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. Journal of General Virology, v. 86, p. 2697–2702, 2005.
- HENDERSON, G.; ZHANG, Y.; INMAN, M.; JONES, D.; JONES, C. Infected cell protein O encoded by bovine herpesvirus 1 can activate caspase 3 when overexpressed in transfected cells. Journal of General Virology, v. 85, p. 3511-3516, 2004.

- HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; CAIXETA, S.P.M.B.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, J.R.; DEZEN, D.; VARELA, A.P.M.; FRANCO, A C.; ROEHE, P.M. Prevalência de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil. In: 35º Conbravet – CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, Gramado – RS, 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0777-1.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2012.
- HUCK, R. A.; MILLAR, P. G.; EVANS, D. H.; STABLES, J. W.; ROSS, A. penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. *Veterinary Record*. v. 88, p. 292-297, 1971.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 dez. 2011.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses, 2009. Disponível em <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>. Acesso em: 16 dez. 2011.
- ISERNHAGEN, A. J. Meningoencefalite herpética em bezerros: evolução clínica e diagnóstico. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. Manual de Microbiologia Médica. Manual Moderno, 1973.
- JOHNSTON, L.A.Y., SIMMONS, G.C., MCGAVIN, M.D., A viral meningoencephalitis in calves. *Australian Veterinary Journal*, v. 38, p. 207-215, 1962.
- JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews*, v. 8, p.187-205, 2008.
- JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PEREZ, S.; ZHANG, Y. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) genes expressed during latency. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p. 199 – 210, 2006.
- 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, p. 289-298, 2006.
- KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. Chapter 8. In: *Viral Disease of Cattle*. Edition 2. Iowa State University Press, p.159-170, 2001.

- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Appendix VIII Blood Analyte Reference Values in Large Animals, 882p. *In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, sixth edition, 928 pgs, 2008.
- KEHRLI, M. E.; NONNECKE, B. J.; ROTH, J. A. Alterations in bovine peripheral blood neutrophil function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, p. 207–214, 1989.
- KREMER, W. D. J.; BURVENICH, C.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N.; GROMMERS, F. J.; SCHUKKEN, Y. H.; HEERINGA R.; BRAND, A. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 76, p. 3428-3436, 1993.
- KUPFERSCHIMIED, H. U.; KIHLM, U.; BACHMAN, P.; MOLLER, K. H.; ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*, v. 25, p. 439-443, 1986.
- LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v.138, p.167 180, 1994.
- LI, B. Q.; TAO, F.; DONGYAN, Y.; KANG, E. A. Flavonoid Baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, p. 534-538, 2000.
- LIU, S.; LU, H.; ZHAO, Q.; HE, Y.; NIU, J.; DEBNATH, A. K.; WU, S.; JIANG, S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in Green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 25, p. 270-281, 2005.
- LOVATO, L.; INMAN, M.; HENDERSON, G.; DOSTER, A.; JONES, C. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *Journal of Virology*, v. 77, p. 4848-4857, 2003.
- MECHOR, G. D.; ROUSSEAU, C. G.; RADOSTITS, O. M.; BABIUK, L. A.; PETRIE, L. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 51, p. 452-459, 1987.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*, v. 30, p. 347-350, 2000.
- MEDINA, M. R.; SÁNCHEZ, M. A.; DIAZ DE ARCE LANDA, H.; BARRERA VALLE, M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Bovine herpesvirus 1*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 7, p. 59-66, 2009.

- MEDRONHO, R.A.; BLOCH, K.V.; LUIZ, R.R.; WENECK, G.L. Amostragem. *In*: Epidemiologia. São Paulo: Atheneu, p. 403-414, 2009.
- METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives of Virology*, v. 87, p. 205–217, 1986.
- MEURENS, F.; KEIL, G. M.; MUYLKENS, B.; GOGEV, S.; SCHYNTS, F.; NEGRO, S.; WIGGERS, L.; THIRY, E. Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesvirus 1. *Journal of Virology*, v. 78, p. 9828-9836, 2004.
- MILLER, J. M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Veterinary Medicine*, v. 86, p. 95-98, 1991.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Effect primary and recurrent infectious bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, p.1434-1437, 1985
- MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology*, v. 75, p.145-153, 2000.
- MORETTI, B.; ORFEI, Z.; MONDINO, G.; PERSECHINO, A. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. *Veterinaria Italiana*, v. 15, p. 676–702, 1964.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, J. M. *Veterinary Virology*, p.301-325, 1999.
- MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. *Bovine herpesvirus 1* infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, v. 38, p.181-209, 2007.
- NOBEL, R. L.; JOBST, S. M.; DRANSFIELD, M. B. G.; PANDOLFI, S. M.; BALLEY, T. L. Use of radio frequency data communication system, HeatWatch, to describe behavioural estrus in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 179, 1997.
- NYAGA, P. N.; MCKERCHER, D. G. Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. *Comparative immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 2, p. 587-602, 1979.
- OGTR - Office of the Gene Technology Regulator - The biology of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), 1-24p. Department of Healthy and Ageing – Australian Government, 2005. Disponível em: [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/herpes3/\\$FILE/biologybovineherpesvirus.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/herpes3/$FILE/biologybovineherpesvirus.pdf). Acesso em 23 jan. 2012.

- OIE - World Organization for Animal Health. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.4.13, 2008.
- OLMOS, A.; ESTEBAN, O.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. Nested RT-PCR in a Single Closed Tube, 151 – 159p. *In: Methods in Molecular Biology*, v. 226: PCR Protocols, 2 ed. Edited by John M. S. Bartlett and David Stirling, Springer Verlag Publishing, Human Express Inc, 545 pgs. Totowa, NJ, 2003.
- OSÓRIO, F. A. Status of Bovine Herpesvirus-1 infections in North America. *In: Simpósio Internacional Herpesvírus Bovino e Diarréia Viral Bovina*, Santa Maria. Anais, UFSM, p.73-74, 1998.
- PARSONSON, I.M., SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with or semen contaminated with IBR virus. *Australian Veterinary Journal*, v. 51, p. 365-369, 1975.
- PASTORET, P. P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G.; VINDEVOGEL, H. The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis. *In: Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine*, G.Wittmann, R. Gaskell and R.-J. Rziha (eds) (Martinus Nijhoff, The Hague), p. 211–228, 1984.
- PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRÍES, G.A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça holandesa em lactação. *Scientia Agricola*, v.58, p. 649-654, 2001.
- PEREZ, S. E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J. H.; ODRIÓZOLA, E.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C. Análisis retrospectivo de casos com diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 35, p. 69–73, 2003.
- PIMENTEL, C. Repetição de serviço - “Repeat breeding”. *In: Simpósio Nacional de Reprodução Animal*. Anais... Belo Horizonte, MG, v. 5, p. 17-36, 1983.
- PITUCO, E. M. Aspectos clínicos, prevenção e controle da IBR. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, 2009.
- POST, T.B. Post-partum anoestrus in different cattle genotypes. *In: Seibert, B.D. (Ed.), Proc. Sympos. ‘Fertility of Tropical Cattle’*. CSIRO, Rockhampton, p. 29–33, 1980.
- PROBST, U.; WYLER, R.; KIHLM, U.; ACKERMANN, M.; BRUCKNER, L.; MULLER, H.K.; EHRENSPERGER, F. Excretion of IBR vírus, especially in Milk, in experimentally infected cows. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, v. 127, p.723-733, 1985.
- PSIFID, A.; DOVAS, C. I.; BANOS, G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and Cellular Probes*, v. 24, p. 93-98, 2010.

- REED, D. E.; BICKNELL, E. J.; BURY, R. J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 163, p. 753–755, 1973.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50% endpoints. *American Journal of Hygiene*, v. 27, p.493-497, 1938.
- RENSIS, R.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproductions in the dairy cow – a review. *Theriogenology*, v. 60, p. 1139-1151, 2003.
- RESENDE, O. A. Problemas não-infecciosos que afetam a reprodução de bovinos: visão do veterinário de campo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte - MG, v. 25, 2001.
- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvirus bovino-1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 9, p. 13-16, 1989.
- RIET-CORREA, G.; DUTRA DUARTE, M.; BARBOSA, J. D.; CHAVES OLIVEIRA, C. M.; DUARTE CERQUEIRA, V.; DE FARIAS BRITO, M.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e poliencfalomalacia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, p. 44–46, 2006.
- RISSI, D. R. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5). Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria - RS, 2006.
- ROBERTS, A. W.; CARTER, G. R.; CARTER, F. A. Infectious bovine rhinotracheitis virus recovered from milk of a cow with mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , v. 164, 413 p., 1974.
- ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, p. 373-380, 1999.
- ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, p. 645-647, 2001.
- ROCK, D.; LOKENSGARD, J.; LEWIS, T.; KUTISH, G. Characterization of dexamethasone induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology*, v. 66, p. 84-90, 1992.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, v. 123, p. 425-449, 1992.

- ROIZMAN, B.; PELLETT, P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.). Fields Virology, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins publishers, p. 2381–2398, 2001.
- SAEG - Sistema para análises estatísticas e genéticas, 1999. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. Versão 8.1.
- SAIRA, K.; JONES, C. BHV-1 gene encoding infected cell protein (BICP0) inhibits antiviral signaling by inducing IRF3 degradation. In proceedings of the 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, abstract 8.39, 2006.
- SALVADOR, J. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSORIO, A. R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e Sao Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 18, p. 75–82, 1998.
- SCHUDEL, A. A.; CARRILLO, B. J.; WYLER, R.; METZLER, A. E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, v. 33, p. 303–310, 1986.
- SCHULTZ, R. D.; HALL, C. E.; SHEFFY, B. E.; KAHRS, R. F.; BEAN, B.H. Current status of IBR/IPV virus infection in bulls. Proceedings of the United States Animal Health Association, v. 80, p. 159-168, 1976.
- SERKEDJIVA, J.; IVANCHEVA, S. Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L. Journal of Ethnopharmacol, v. 64, p. 59-68, 1999.
- SIEGLER, H. H.; MARSCHANG, F.; MORSCHER, H. Beobachtungen u“ber Zusammenh“nge zwischen Virus infectionen und boviner Mastitis. Tierärztl. Umschau, v. 39, p. 602–604, 1984.
- SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; LORETO, E. L. S.; WEIBLEIN, R.; FLORES, E. F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. Virus Research, v. 129, p. 191-199, 2007.
- Sites de internet: http://www.virology.net/big_virology/bvdnaherpes.html (The Big Picture Book of Viruses: Herpesviridae); <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/herpes.html> (Herpesvirus). Acesso em 18 jan 2012.
- SNOWDON, W.A. The IBR/IPV virus-reaction to infection and intermittent recovery of the virus from experimentally inoculated cattle. Australian Veterinary Journal, v. 41, p. 135-142, 1965.
- SOULSBY, E.J. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. Immunology Letters, v.16, p. 315-320, 1987.

- STANCIOLI, E. F. B. IBR se dissemina. Cultivar Bovinos - Artigos técnicos. N.01, 2003. Disponível em <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=164#>. Acesso em 17 dez. 2011.
- STRAUB, O.C. Advances in BHV-1 (IBR) research. Dtsch Tierarztl Wochenschr, v. 108, p. 419-422, 2001.
- STRAUB, O. C.; KIELWEIN, G. Experimentelle mastitiden durch das Blaßsenausschlagvirus des Rindes. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschrift, v. 79, p. 310–312, 1966.
- THIRY, E.; ACKERMANN, M.; BANKS, M.; BELAK, S.; CAMPBELL, I.; EKKOMMONEN, C.; ENGELS, M.; MEYER, G.; REID, H.; ROS, C.; SIX, A. Risk evaluation of cross-infection of cattle with ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus type 1. In: Körber, R. (Ed.), Tagungsbroschüre, 3. International Symposium zur BHV-1-/BVD-Bekämpfung, Stendal, p. 99–104, 2001.
- THIRY, E.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; THIRY, J.; VANDERPLASSCHEN, A.; SCHYNTS, F. Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. Veterinary Microbiology, v. 113, p.171-177, 2006.
- TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. Advances in virus research, v. 5, p. 191-223, 1995.
- VAN DER ENGELBURG, F. A. C.; VAN SCHIE, F. W.; RIJSEWIJK, F. A. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. Journal of Clinical Microbiology, v. 33, p. 308-312, 1995.
- VAN OIRSCHOT, J. T. The BHV-1 situation in Europe. In: Simpósio Internacional de Herpesvírus Bovino e Diarréia Viral Bovina, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, p. 69-72, 1998.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M.; RIJSEWIJK, F. A. M. Advances in development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. Veterinary Microbiology, v. 53, p.43-54, 1996.
- VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S. V.; BASTOS, G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 4512-4520, 2003.
- VOGEL, F. S. F.; LIMA, M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S. V.; MAZZUTTI, K. C.; ARENHART, S. 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). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, p. 1619-1621, 2004.

- WANG, J.; O'KEEFE, J.; ORR, D.; LOTH, L.; BANKS, M.; WAKELEY, P.; WEST, D.; CARD, R.; IBATA, G.; VAN MAANEN, K.; THOREN, P.; ISAKSSON, M.; KERKHOF, P. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen, *Veterinary Microbiology*, p. 11-19, 2008.
- WAYNE ROBERTS, A.; CARTER, G. R. Infectious bovine rhinotracheitis virus recovered from the milk of a cow with mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 164, 413p., 1974.
- WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H. M.; VAN DER VORST, T. J. K.; VAN VALKENGOED, P. H. R.; SCHUKKEN, Y. H.; WAGENAAR, F.; VAN OIRSCHOT, J. T. Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. *Veterinary Record*, v. 147, p. 222-225, 2000.
- WORKMAN, A.; PEREZ, S.; DOSTER, A.; JONES, C. Dexamethasone treatment of calves latently infected with Bovine herpesvirus 1 leads to activation of the bICP0 early promoter, in part by the cellular transcription factor C/EBP-Alpha. *Journal of Virology*, v. 83, p. 8800-8809, 2009.
- WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BoHV-1). In: G. Wittman and Y. Becker, *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Developments in veterinary virology ser.* Kluwer Academics Publishers, Boston, v. 1, p. 1-72, 1989.
- XIA, J. Q.; LOFSTEDT, R. M.; YASON, C. V.; KIBENG, F. S. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridization, polymerase chain reaction and virus isolation. *Research in Veterinary Science*, v. 59, p. 183-185, 1995.
- ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 447-545, 2001.
- ZHANG, M.; FU, S.; DENG, M.; XIE, Q.; XU, H.; LIU, Z.; HU, C.; CHEN, H.; GUO, A. Attenuation of bovine herpesvirus type 1 by deletion of its glycoprotein G and tk genes and protection against virulent viral challenge. *Vaccine*, v. 48, p. 8943-8950, 2011.
- ZHOU, Z.H.; PRASAD, B.V.; JAKANA, J.; RIXON, F.J.; CHIU, W. Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology*, v. 242, p. 456-469, 1994.