

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Disciplina: SEMINÁRIOS APLICADOS

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ANATOMOPATOLÓGICO DAS  
PRINCIPAIS ENCEFALITES VIRAIS DE BOVINOS NO BRASIL**

Danilo Rezende e Silva

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA

2012

DANILO REZENDE E SILVA

## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ANATOMOPATOLÓGICO DAS PRINCIPAIS ENCEFALITES VIRAIS DE BOVINOS NO BRASIL**

Seminário apresentado junto à Disciplina  
Seminários Aplicados do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal da Escola  
de Veterinária e Zootecnia da Universidade  
Federal de Goiás. Nível: Mestrado

**Área de concentração:**

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Linha de Pesquisa:**

Patobiologia animal, experimental e comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo - EVZ/UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Guido F. Coelho Linhares - EVZ/UFG

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha – EVZ/UFG

GOIÂNIA  
2012

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 Encéfalo de bovino positivo para raiva, vista dorsal. Hiperemia difusa dos vasos das leptomeninges (setas). Fonte: RECH, 2007. 05
- Figura 2 Encéfalo de bovino sem lesões, corte sagital. Regiões do encéfalo a serem consideradas no diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso central de bovinos. 1 – bulbo na altura do óbex; 2 – cerebelo; 3 – ponte com os pedúnculos cerebelares; 4 – mesencéfalo na altura dos colículos rostrais; 5 – córtex occipital; 6 – diencéfalo através da aderência intertalâmica, córtex parietal (CP), hipocampo (HC) e tálamo (TA); 7 – córtex frontal. Fonte: Adaptado de RECH, 2007. 06
- Figura 3 Fotomicrografia de encéfalo bovino positivo para raiva. A) Manguito perivascular linfoplasmocitário composto por 2-4 camadas de células (setas). HE, 40x. B) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico, corpúsculo de Negri (seta). HE, 40x. Fonte: Adaptado de RECH, 2007. 07
- Figura 4 Fotomicrografia de amostras positivas para vírus da raiva. Estruturas fluorescentes são as partículas virais no citoplasma das células (seta). IFD, 10x. Fonte: Adaptado de COSTA et al. (2011). 09
- Figura 5 Fotomicrografia cerebelo bovino. Na imagem evidenciam-se o citoplasma das células de Purkinje com múltiplas marcações circulares, amarronzadas que são corpúsculos de inclusão viral da raiva (setas). Imunoistoquímica para raiva (rabies polyclonal DFA reagent) na diluição de 1:200 com revelação pelo método diaminobenzidina (DAB). Fonte: Adaptado de STEIN et al., 2007. 10
- Figura 6 Cortes seriados de encéfalo bovino. Os pontos vermelhos representam a intensidade de marcação imunoistoquímica em cada corte. 1: medula espinhal; 2: secção do bulbo na altura do óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral; 8: tálamo; 9: cerebelo; 10: córtex frontal; 11: córtex parietal; 12: córtex temporal; 13: córtex occipital. Fonte: PEDROSO, 2008. 11

- Figura 7 Encéfalo de bovino. Alterações macroscópicas na infecção por herpesvírus bovino-5. A) Vista dorsal do encéfalo, áreas multifocais de malacia associada à intensa hemorragia (área tracejada). B) Áreas de depressão do córtex telencefálico em conjunto com áreas amolecidas (área tracejada). Fonte: RECH, 2007. 15
- Figura 8 Encéfalo de bovino. Infecção experimental por BoHV-5. A) Encéfalo, vista dorsal. Extensa área de atrofia no lobo frontal esquerdo. B) Encéfalo vista lateral e aproximada, evidenciando a intensa atrofia do córtex cerebral. Fonte: SPILKI, 2011. 16
- Figura 9 Fotomicrografia de encéfalo bovino com infecção por herpesvírus bovino-5. A) Acentuada quantidade de neurônios vermelhos citoplasma angular, retraído e hipereosinofílico (seta), associado a isso núcleos picnóticos. HE, 10x. B) Área de malacia, com necrose neuronal, destruição do neurópilo e infiltração de células Gitter (seta). HE, 20x. C) Acentuado número de células Gitter (seta) ao redor de um vaso. HE, 20x. D) Todo o neurópilo foi removido, com moderada quantidade de células Gitter remanescentes (setas) e alguns vasos (seta larga). HE, 20x. Fonte: RECH, 2007. 18
- Figura 10 Fotomicrografia de alterações histológicas em bovinos com febre catarral maligna. A) Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na parede das artérias (setas). HE, 10x. B) Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na parede das artérias da rete mirabile, associado à degeneração fibrinóide (seta). HE, 20x. Fonte: GARMATZ, 2004. 24

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BoHV-1	Herpesvírus bovino-1
BoHV-5	Herpesvírus bovino-5
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
FCM	Febre catarral maligna
HE	Hematoxilina & Eosina
hnRT-PCR	<i>heminested</i> RT-PCR
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IFD	Imunofluorescência direta
IPV	Vulvovaginite pustular infecciosa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHV-68	Mouse herpesvírus-68
OHV-2	Herpesvírus ovino-2
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Transcrição reversa da Reação em cadeia da polimerase
SNC	Sistema Nervoso Central
vCJD	enfermidade Creutzfeldt-Jacob
OMS	Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
<b>2.2 Raiva</b> .....	3
2.2.1 Etiopatogenia.....	3
2.2.2 Sinais Clínicos .....	4
2.2.3 Diagnóstico anatomopatológico .....	4
2.2.4 Técnicas complementares .....	9
<b>2.3 Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5</b> .....	13
2.3.1 Etiopatogenia.....	13
2.3.2 Sinais clínicos.....	14
2.3.3 Diagnóstico anatomopatológico .....	15
2.3.4 Técnicas complementares .....	19
<b>2.4 Febre catarral maligna</b> .....	21
2.4.1 Etiopatogenia.....	21
2.4.2 Sinais clínicos.....	22
2.4.3 Diagnóstico anatomopatológico .....	23
2.4.4 Técnicas complementares .....	26
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades virais, que acometem o sistema nervoso central (SNC) dos animais de produção, são relativamente frequentes e grande parte deve ser considerada como possíveis diagnósticos diferenciais nos animais que demonstram sinais neurológicos. Uma grande quantidade de agentes virais tem potencial para infectar o SNC, provocando encefalites ou encefalomyelites. Doenças virais do SNC possuem um tratamento específico limitado e a maioria dessas enfermidades possuem alta letalidade (CALLAN & VAN METRE, 2004).

A década de 80 foi o ápice dos estudos sobre as doenças neurológicas em bovinos, em virtude de surtos de encefalopatia espongiforme bovina (BSE) em rebanhos da Grã-Bretanha. A importância dessa doença não se restringia apenas ao campo da sanidade animal. Em 1996 a BSE foi associada ao aparecimento de uma nova variante da enfermidade Creutzfeldt-Jacob (vCJD) em humanos no Reino Unido (ALMOND & PATTISON, 1997).

No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), implantou um sistema de vigilância epidemiológica para BSE, adicionado a isto foi elaborado o Manual de Procedimentos para o Diagnóstico das Enfermidades do Sistema Nervoso Central de Bovinos (BARROS & MARQUES, 2003). Com isso, tornaram-se cada vez mais frequentes estudos sobre essas enfermidades em diversos estados brasileiros, como na Paraíba (GALIZA et al., 2010), Rio Grande do Sul (SANCHES et al., 2000; RECH, 2007; RISSI et al., 2010), Mato Grosso do Sul e São Paulo (LEMOS, 2005), Minas Gerais (OLIVEIRA et al, 2012) e Goiás (SANTOS et al, 2006).

Dentre as doenças do SNC de bovinos a de maior ocorrência é a infecção pelo vírus da raiva, clinicamente é uma encefalomyelite com alta letalidade, causada por um agente viral do gênero *Lyssavirus*. Caracterizada por uma infecção aguda do SNC, que pode acometer todos os mamíferos, com possibilidade de ser transmitida aos seres humanos, o que caracteriza assim essa doença como uma zoonose. (BRASÍLIA, 2005).

Já a meningoencefalite causada pelo herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5), uma doença infecto-contagiosa, aguda ou subaguda, tem sido relatada como a segunda causa mais frequente de meningoencefalite viral em bovinos no Sul do Brasil (SANCHES et al., 2000) e no Centro-Oeste (LEMOS, 2005).

Outra encefalite viral da família Gammaherpesvirinae é a febre catarral maligna (FCM), causada por um agente denominado herpesvírus ovino-2 (OHV-2), onde os ovinos são considerados portadores desse agente viral. Essa enfermidade tem sido frequentemente diagnosticada no Mato Grosso (MENDONÇA et al., 2008), Paraíba (MACÊDO et al., 2007) e Rio Grande do Sul (RECH et al., 2005). O estado de Goiás possui grandes rebanhos bovinos associadotem ao aumento da ovinocultura, frequentemente propriedades que adotam a criação promíscua de ovinos e bovinos, há um maior contato dos bovinos com cepas virais de OHV-2.

Esse seminário tem o objetivo de realizar uma revisão das principais encefalites virais nos bovinos, utilizando as alterações anatomopatológicas como exame complementar no diagnóstico diferencial.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2 Raiva

#### 2.2.1 Etiopatogenia

O vírus da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*, e contem no seu genoma uma fita simples de RNA. A doença é caracterizada por uma encefalite aguda e fatal, é considerada a principal zoonose transmitida por vírus. Isso deve-se ao fato da doença ter uma distribuição e incidência mundial, além de ter altos custos tanto na saúde animal quanto humana (NANDI & KUMAR, 2011).

A transmissão do vírus é feita por animais portadores ou animais doentes que inoculam o vírus, que está na saliva, infectando o animal sadio. Além disso, a infecção pode acontecer em feridas recentes, quando em contato com saliva ou material infectado. Pode ocorrer a contaminação das mucosas oral, nasal e ocular dos profissionais ou técnicos que tiveram contato com animais infectados. Há certas evidências de uma terceira forma de transmissão, que é o contato com aerossóis contaminados com partículas virais (BATISTA et al., 2007).

Logo após a infecção, o vírus da raiva irá se ligar aos receptores de acetilcolina nos miócitos do local infectado. Posteriormente, esse vírus invade os terminais axonais dos neurônios motores ou neurônios sensoriais. Em seguida, o vírus progride de forma centrípeta, seguindo o fluxo axonal retrógrado. As partículas virais que adotam a via motora chegam aos cornos ventrais da medula espinhal e núcleos motores do tronco encefálico. As partículas virais que seguem via neurônios sensoriais progridem até os gânglios crânio-espinhais. A progressão viral do músculo até o SNC depende da quantidade de vírus transmitida, local da inoculação, natureza da ferida e estado imunológico do hospedeiro (FERNANDES, 2001; MAXIE & YOUSSEF, 2007).

### 2.2.2 Sinais Clínicos

A enfermidade tem curso clínico de 2 a 10 dias e quando transmitida por morcegos o período de incubação pode variar de 25 a 150 dias. O animal infectado, já no início da manifestação dos sinais clínicos desenvolve decúbito esternal, com progressão para decúbito lateral, movimentos de pedalagem e óbito. Em bovinos a forma clínica predominante é a paralítica, os sinais clínicos mais frequentes são incoordenação dos membros pélvicos, com progressão para paresia e paralisia flácida. Outros sinais clínicos podem ser observados como paralisia da cauda e esfíncter anal, hipoestesia da região pélvica, sialorréia, cegueira, bruxismo, miotonias dos grupos musculares da região da cabeça e opistótono. Alguns animais podem manifestar agressividade e mugidos, sinais comuns na forma furiosa da raiva (FERNANDES, 2001).

### 2.2.3 Diagnóstico anatomopatológico

Frequentemente as enfermidades do SNC não apresentam lesões óbvias à necropsia. Em virtude disso, o profissional que examina o material no laboratório depende de um histórico e de observações clínicas confiáveis para orientação sobre a natureza da doença neurológica (RIET-CORREA et al., 2002).

A excessiva manipulação do encéfalo gera artefatos que atrapalham o exame histopatológico; por isso, quando possível, o exame macroscópico do encéfalo deverá ser feito com o órgão fixado em formol 10% tamponado. Com isso, há uma maior facilidade na escolha das áreas apropriadas para o diagnóstico das enfermidades específicas, além de permitir determinar os prováveis locais de distribuição das lesões. Porém, na maioria dos casos, o encéfalo não pode ser fixado inteiro, devido à necessidade de coletar amostras para exames virológicos e bacteriológicos. Além disso, a inadequada coleta do encéfalo sem a devida separação sistemática, pode diminuir a eficácia do exame anatomopatológico (BARROS & MARQUES, 2003).

A coleta sistemática do encéfalo de bovinos e acondicionamento dessas amostras, devem ser baseados no manual publicado pelo MAPA em 2003. Primeiramente, deve-se promover a desarticulação da região atlanto-occipital, logo após remoção da calota craniana e secção da meninge dura-máter.

A técnica é feita com auxílio de uma tesoura, a qual se deve remover todo o encéfalo, seccionando os ramos dos nervos cranianos. Feito isso, deve ser removido o cerebelo, cortando no nível dos pedúnculos cerebelares. Com isso, todo o cerebelo ficará separado do encéfalo e com um corte retira-se um fragmento sagital (cerca 0,5cm) do verme cerebelar. Em seguida, o tronco encefálico deve ser separado do resto do encéfalo, com um corte na altura do tálamo. O segundo fragmento é obtido com uma secção transversal, cerca de 2cm, da medula espinhal cervical. O terceiro fragmento é obtido a partir do corte, com aproximadamente 1cm de espessura, do tálamo. O último passo é a divisão dos hemisférios cerebrais na altura do quiasma óptico, separando uma parte do lobo occipital do restante. Os três fragmentos e a amostra do córtex occipital devem ser refrigeradas e remetidas em refrigeração, para diagnóstico virológico. O restante do SNC deve ser acondicionado em frasco de boca larga e fixado em formalina 10% tamponada, para exame histopatológico. Deve-se, também, enviar o monobloco, constituído pela rete mirable, gânglio do nervo trigêmeo e hipófise, fixado em formol 10% (BARROS & MARQUES, 2003).

As alterações macroscópicas que podem ser observadas são hiperemia dos vasos leptomeníngios (Figura 1) e discretos focos de hemorragia (LANGOHR, 2001).

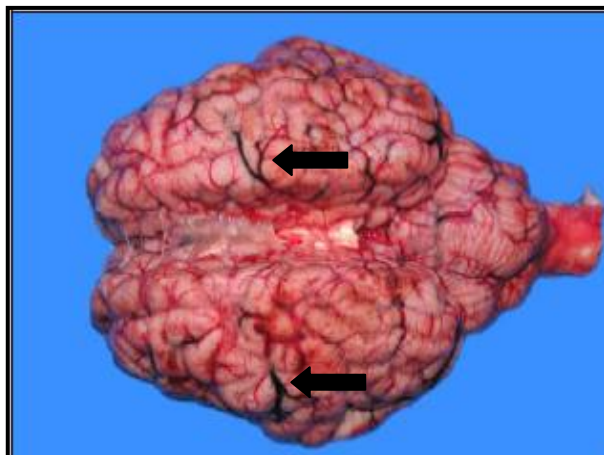


FIGURA 1 – Encéfalo bovino positivo para raiva, vista dorsal. Hiperemia difusa dos vasos das leptomeninges (setas).  
Fonte: RECH, 2007.

Em um estudo retrospectivo, referente às doenças do SNC de bovinos e equinos, RISSI et al. (2010) avaliaram o encéfalo de 197 bovinos positivos para raiva e observaram hiperemia dos vasos meningeais em 50% dos casos. LIMA et al. (2005) relataram que achados macroscópicos inespecíficos, ou de pouca importância clínica, tais como, distensão da bexiga, ampola retal distendida e repleta de fezes, podem ser observados.

As alterações microscópicas são de natureza e intensidade variáveis, é possível estabelecer graduações da intensidade da lesão de acordo com o local anatômico do encéfalo acometido (Figura 2). As principais lesões são manguitos perivasculares, infiltrado inflamatório nas meninges, corpúsculos de Negri, degeneração e necrose neuronal, hemorragia, microgliose, neuroniofagia e satelitose (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005; PEDROSO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

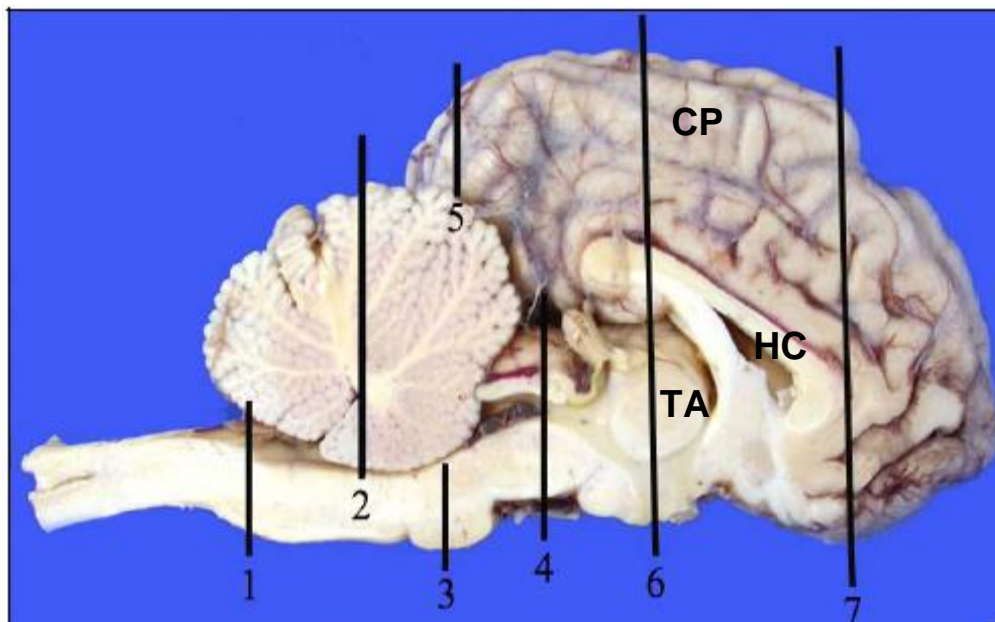


FIGURA 2 - Encéfalo bovino sem lesões, corte sagital. Regiões do encéfalo a serem consideradas no diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso central de bovinos. 1 – bulbo na altura do óbex; 2 – cerebelo; 3 – ponte com os pedúnculos cerebelares; 4 – mesencéfalo na altura dos colículos rostrais; 5 – córtex occipital; 6 – diencéfalo através da aderência intertalâmica, córtex parietal (CP), hipocampo (HC) e tálamo (TA); 7 – córtex frontal.

Fonte: Adaptado de RECH, 2007.

Um estudo realizado por LANGOHR et al. (2003), mostrou que os mangitos perivasculares e infiltrado inflamatório nas meninges são compostos principalmente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os locais onde os mangitos foram mais frequentes são, bulbo na altura do óbex, ponte, substância branca do cerebelo, mesencéfalo e tálamo (Figura 3A). Já o infiltrado inflamatório nas meninges foi observado, principalmente, na substância cinzenta do cerebelo. Os corpúsculos de Negri (Figura 3B) foram encontrados no encéfalo de 17 (68%) do total de 25 casos examinados e o principal local onde foram observados foi nas células de Purkinje da substância cinzenta do cerebelo.

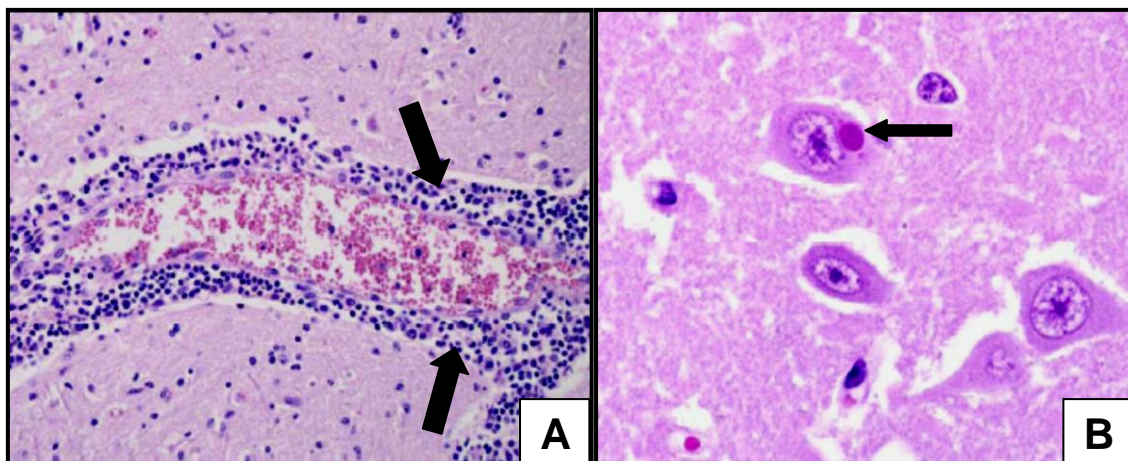


FIGURA 3 – Fotomicrografia de encéfalo bovino positivo para raiva. A) Manguito perivascular linfoplasmocitário composto por 2-4 camadas de células (setas). HE, 40x. B) Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico, corpúsculo de Negri (seta). HE, 40x.  
Fonte: Adaptado de RECH, 2007.

Manguitos perivascular e infiltrado inflamatório nas meninges ocorrem principalmente no mesencéfalo, ponte, cerebelo, bulbo e medula cervical. Observaram a presença de corpúsculos de Negri em 87% dos casos, principalmente no córtex frontal, parietal, temporal, núcleos da base e cerebelo (LIMA et al., 2005). PEDROSO et al. (2009), analisaram amostras provenientes de 15 bovinos com sintomatologia nervosa e em 13 (86,6%) foram observados corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (corpúsculos de Negri), localizados nas células de Purkinje e nos neurônios do gânglio trigêmeo. Os manguitos perivascular e meningite linfoplasmocitária também foram observados no referido estudo. OLIVEIRA et al. (2012) observaram que a frequência dos corpúsculos de Negri foi maior no cerebelo, tálamo, tronco encefálico e medula cervical, enquanto que o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário foi pouco frequente no telencéfalo, quando comparado ao tronco e cerebelo.

#### 2.2.4 Técnicas complementares

A identificação viral da raiva é realizada por métodos auxiliares de diagnóstico, como a IFD (SANTOS et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012), imunistoquímica (PEDROSO, 2008; STEIN et al., 2010; FAIZEE et al., 2012) e PCR (ROJAS et al., 2006; EVANS, 2009; ARAÚJO et al., 2008).

Segundo a OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (2011) a técnica laboratorial amplamente utilizada para o diagnóstico de raiva é a imunofluorescência direta (IFD), recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Este método laboratorial é considerado como “padrão-ouro”, pois possui uma alta especificidade e sensibilidade, e o custo é baixo quando comparada à outras técnicas. Para o diagnóstico, as amostras do tecido cerebral são fixadas em acetona 100% pura fria por, no mínimo, 20 minutos. Posteriormente, as amostras são secas à temperatura ambiente; em seguida, são coradas com um conjugado específico por 30 minutos à temperatura de 37°C. Conjugados específicos anti-rábicos disponíveis comercialmente são anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para o vírus ou para proteína do capsídeo. Ao conjugado é adicionado isotiocianato de fluoresceína. Ao examinar em um microscópio de fluorescência, com filtro apropriado, as amostras positivas serão fluorescentes. A eficácia da técnica de imunofluorescência depende muito das condições em que o material é encaminhado para o laboratório.

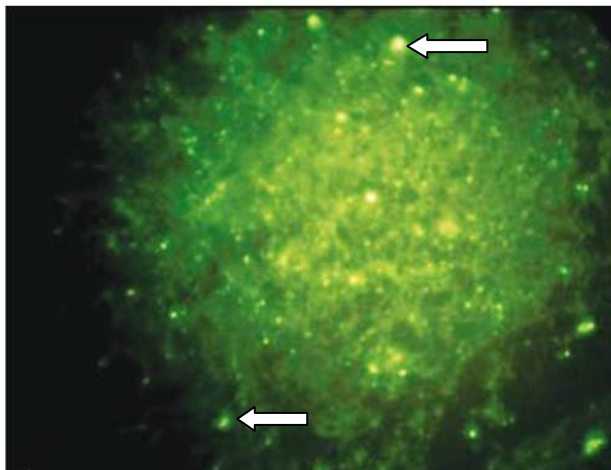


FIGURA 4 - Fotomicrografia de amostra positiva para vírus da raiva. Estruturas fluorescentes são as partículas virais no citoplasma das células (seta). IFD, 10x.  
Fonte: COSTA et al. (2011)

Em um estudo retrospectivo laboratorial da raiva, realizado em 1999, no estado de Goiás, foram analisadas 184 amostras de encéfalo bovino, com suspeita clínica de raiva, e 36,4% foram positivas. Nos dois anos seguintes foram observados, respectivamente, resultados positivos para raiva em bovinos, 58% e 67,5% (SANTOS et al., 2006). No estado de Minas Gerais, no período de 2003 a 2010, foram analisadas 3703 amostras e 41,58% foram positivas para raiva pela IFD (OLIVEIRA et al., 2012).

O teste de imunofluorescência foi utilizado por TEIXEIRA et al. (2008) para avaliar surtos de raiva no Rio Grande do Sul, no período de 1985 a 2007. Os autores identificaram 739 amostras positivas, desse total, 656 (88,7%) foram de encéfalo bovino.

Na região noroeste do estado de São Paulo, QUEIROZ et al. (2009) diagnosticaram 50 (10%) casos positivos em amostras de encéfalo de bovinos, de um universo amostral de 518 positivas para raiva pela IFD.

Outro método de diagnóstico utilizado para identificação viral nos casos de raiva é a imunistoquímica, caracterizada como um processo que identifica antígenos em amostras teciduais utilizando anticorpos específicos. Conforme STEIN et al. (2010), a marcação nos encéfalos de bovinos foi mais frequente no citoplasma de neurônios (Figura 5) do tronco encefálico e a reação obtida foi



intensa e difusa. O cerebelo foi o segundo local com maior reatividade para o vírus da raiva.

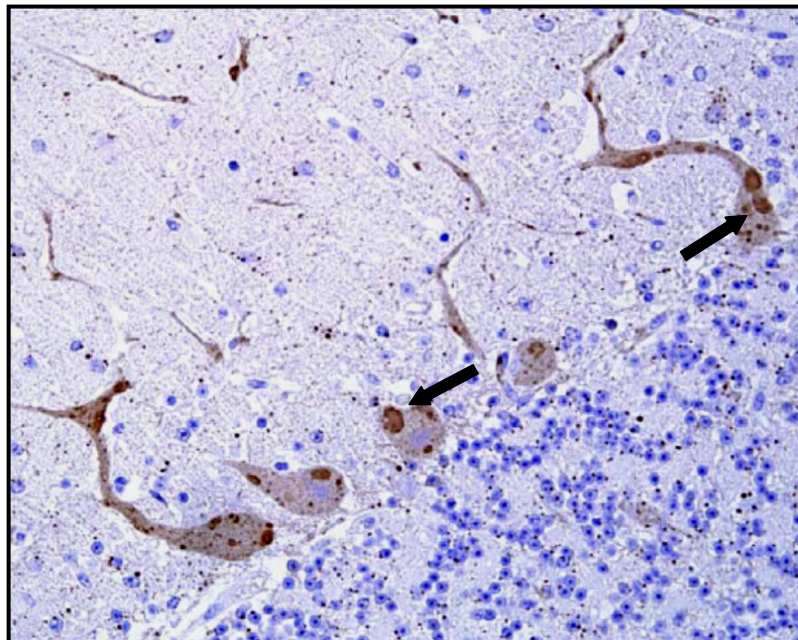


FIGURA 5 - Fotomicrografia de cerebelo bovino. Na imagem evidenciam-se o citoplasma das células de Purkinje com múltiplas marcações circulares, amarronzadas, que são corpúsculos de inclusão viral da raiva (setas). Imunoistoquímica para raiva (rabies polyclonal DFA reagent) na diluição de 1:200 com revelação pelo método diaminobenzidina (DAB).

Fonte: Adaptado de STEIN et al., 2007.

PEDROSO (2008) realizou imunoistoquímica em cortes seriados do SNC e no óbex, pedúnculo cerebelar rostral, pedúnculo cerebelar caudal, pedúnculo cerebelar medial, colículo caudal e gânglio trigêmeo, e obteve 100% de imunomarcção para vírus da raiva (Figura 6). Já na medula espinhal, tálamo, cerebelo e córtex frontal a marcação foi de 83%. Nos córtices parietal, occipital e temporal, a marcação foi de 81%, 66% e 63%, respectivamente. Além disso, foi relatado que todos os casos foram positivos pela técnica de IFD.

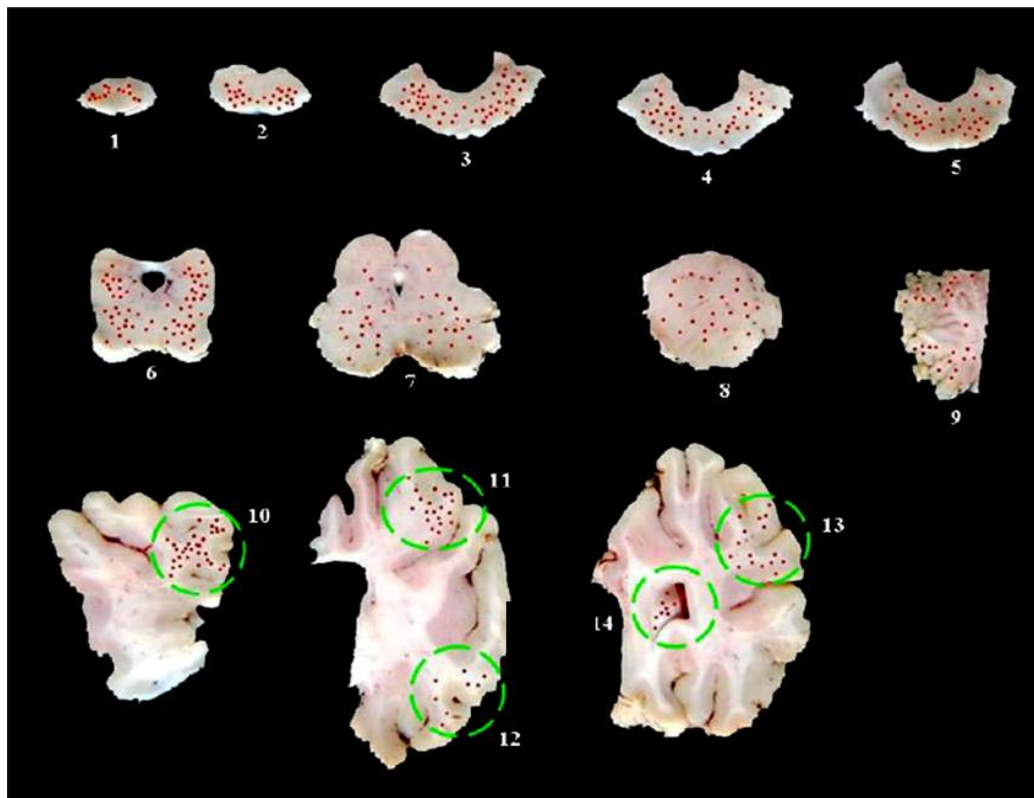


FIGURA 6 – Cortes seriados de encéfalo bovino. Os pontos vermelhos representam a intensidade de marcação imunoistoquímica em cada corte. 1: medula espinhal; 2: secção do bulbo na altura do óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral; 8: tálamo; 9: cerebelo; 10: córtex frontal; 11: córtex parietal; 12: córtex temporal; 13: córtex occipital.  
Fonte: PEDROSO, 2008.

FAIZEE et al. (2012) analisaram 28 amostras de diferentes espécies animais, sendo cinco da espécie bovina. Para diagnóstico utilizaram as seguintes técnicas: histopatologia, IFD e imunoistoquímica. Pelo método de IFD três animais foram positivos para raiva, dentre esses somente um caso, ao exame histopatológico, foram visualizadas lesões características da raiva. Posteriormente, realizaram imunoistoquímica, onde não detectaram presença de corpúsculos virais em nenhum dos três casos. Além disso, procederam o diagnóstico molecular utilizando a técnica de RT-PCR (Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase) e detectaram a presença do RNA viral em três animais, sendo que dois destes não foram avaliados pela IFD.

Experimentalmente, ROJAS et al. (2006) inocularam o vírus da raiva em 72 camundongos e realizaram RT-PCR nos encéfalos, submetidos a duas temperaturas de acondicionamento: 25 a 27°C e refrigerados a -70°C. Os autores detectaram RNA viral, nos encéfalos que foram mantidos na temperatura entre 25-27°C, após 23 dias da eutanásia.

ARAÚJO et al. (2008) avaliaram 151 amostras de bovinos e equinos e realizaram RT-PCR e *heminested* RT-PCR (hnRT-PCR). Os resultados indicaram que somente 50 amostras (18 de equinos e 32 de bovinos) foram positivas pelas técnicas de IFD e inoculação em camundongos. As 101 amostras que foram negativas nesses dois métodos, também foram negativas pelo RT-PCR e pelo heminested RT-PCR. Nas 50 amostras previamente positivas, o método de hnRT-PCR foi o mais sensível. Portanto, o diagnóstico molecular do vírus da raiva pode ser realizado pelas diversas técnicas de PCR, desde que a amostra encaminhada esteja em condições apropriadas para detecção do RNA.

## **2.3 Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5**

### 2.3.1 Etiopatogenia

A meningoencefalite pelo herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5) é considerada uma doença infecto-contagiosa, aguda ou subaguda, que na maioria dos casos é fatal, e afeta principalmente o SNC de bovinos jovens. O BoHV-5 é classificado na família *Hesperviridae* e sub-família *Alphaherpesvirinae*. Os vírus agrupados nessa sub-família possuem DNA linear de fita dupla e envelope glicoprotéico (ROIZMANN et al., 1992). O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), sub-família *Alphaherpesvirinae*, está associado a várias síndromes, como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite, conjuntivite e abortos (DAVISON et al., 2009). Entretanto, BoHV-1 tem sido isolado em encéfalos de bovinos com sintomatologia neurológica. Em um estudo retrospectivo realizado por ELY et al. (1996), de 32 casos classificados histologicamente como meningoencefalite não-supurativa e negativos para raiva, uma amostra foi positiva para BoHV-1 utilizando *PCR* em amostras incluídas em parafina.

BATISTA et al. (2010) analisaram 70 amostras de encéfalos bovinos coletados no Rio Grande do Sul, entre elas duas positivas para BoHV-1 em sua forma infecciosa. Os autores detectaram também, o vírus da raiva, em uma dessas duas amostras.

A meningoencefalite por BoHV-5 é uma das principais doenças do SNC de bovinos na região Centro-oeste do Brasil (SALVADOR et al., 1998; DE PAULA et al., 2005), e tem sido diagnosticada em outros estados, como São Paulo (SALVADOR et al., 1998) e Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2007; RISSI et al., 2008).

Entre os animais infectados pelo BoHV-5, mesmo aqueles que não desenvolvem sintomatologia clínica, tornam-se portadores pelo resto da vida. O herpesvírus pode estabelecer infecção latente nos gânglios dos nervos sensoriais, com a possibilidade de reativação nos casos de estresse por transporte, parto, desmame, confinamento e tratamento com corticosteroides. O animal que se torna portador do vírus é considerado uma fonte de infecção na propriedade. A principal porta de entrada do agente é a mucosa do sistema respiratório. O vírus tem uma acentuada multiplicação no sítio da infecção, com isso irá invadir as terminações nervosas locais, seguindo fluxo até os gânglios sensoriais da região. Em seguida, as cepas virais, potencialmente neurotrópicas, poderão atingir o sistema nervoso central, provocando meningoencefalite (HALFEN & VIDOR, 2001).

### 2.3.2 Sinais clínicos

A evolução dos sinais clínicos pode variar de 3 a 10 dias. Esses sinais são perceptíveis após um período de incubação entre 7 e 10 dias após a infecção (HALFEN & VIDOR, 2001).

Os bovinos com a infecção ficam separados do rebanho, olhar fixo e cabeça baixa. A maioria dos animais acometidos apresenta corrimento nasal e ocular seroso; que com a evolução da doença, torna-se mucopurulento. Frequentemente, esses animais desenvolvem cegueira, bruxismo, andar em círculos, febre, movimentos de pedalagem, incoordenação dos membros pélvicos, decúbito, nistagmo, tremores, anorexia e pressão da cabeça contra objetos.

Podem ser observados também, mas com menor frequência, taquicardia, taquipnéia, disfagia, dor abdominal, melena e pêlos arrepiados (RIET-CORREA et al., 2006.; RISSI et al., 2006).

### 2.3.3 Diagnóstico anatomopatológico

Os bovinos com meningoencefalite por BoHV-5 podem não apresentar lesões macroscópicas no encéfalo (RIET-CORREA et al., 2006). A ausência de alterações durante a necropsia também foi relatada por SALVADOR et al. (1998), onde no total de 21 casos, nove não apresentaram lesões macroscópicas e sete apresentaram alterações inespecíficas, como congestão.

De acordo com COLODEL et al. (2002) dos 13 casos analisados, cinco não apresentaram alterações ao exame de necropsia. Em dois casos foram observados achatamento das circunvoluções cerebrais e áreas multifocais, irregulares, de coloração amarelada (Figura 7B), superfície deprimida e aspecto finamente granular, estas características são compatíveis com a descrição de malacia cortical cerebral. Essas lesões de malacia estão associadas a áreas de hemorragias (Figura 7A).

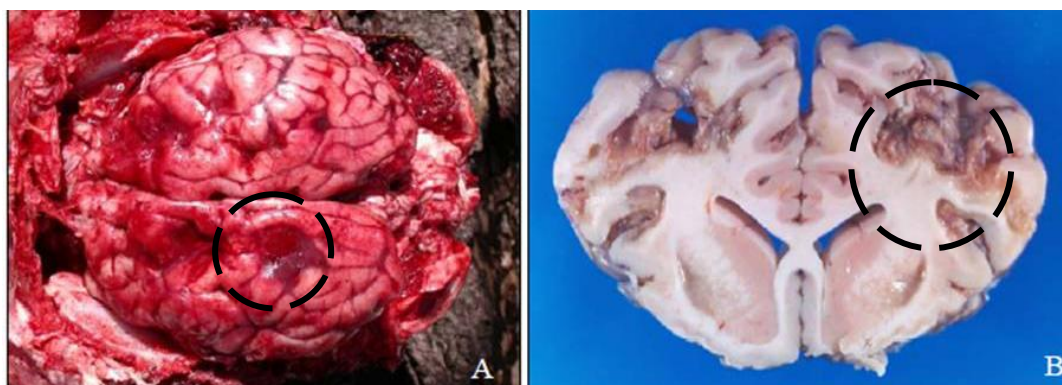


FIGURA 7 – Encéfalo de bovino. Alterações macroscópicas na infecção por herpesvírus bovino-5. A) Vista dorsal do encéfalo, áreas multifocais de malacia associada a intensa hemorragia (área tracejada). B) Áreas de depressão do córtex telencefálico em conjunto com áreas amolecidas (área tracejada).  
Fonte: RECH, 2007.

RISSI et al. (2006) observaram, no total de 19 surtos, quatro casos sem lesões macroscópicas, quatro casos com lesões circulatorias discretas e dez com lesões inflamatórias e degenerativas acentuadas. As lesões discretas eram principalmente hiperemia dos vasos das leptomeninges e as lesões moderadas foram caracterizadas por tumefação e achatamento das circunvoluções do córtex frontal, associado a áreas de malacia. Nos casos mais graves foram encontrados acentuadas depressões do córtex telencefálico, principalmente no córtex frontal.

De modo semelhante ELIAS et al. (2004), procederam necropsia de 12 bovinos com suspeita de infecção pelo BoHV-5. Desse total, somente cinco animais apresentaram lesões macroscópicas e a principal alteração foi malacia no lobo frontal, porém também foi observada (em menor frequência) nos córtices temporal e occipital. Além disso, encontraram áreas de hemorragia e congestão na substância branca.

A infecção por BoHV-5 foi induzida, experimentalmente, em três bovinos por SPILKI et al. (2011), os quais observaram extensas áreas de atrofia no córtex frontal (Figura 8 A e B) e no córtex parietal. Essas áreas apresentavam coloração amarelo-alaranjado, e alguns casos também foram observadas na base do cérebro.

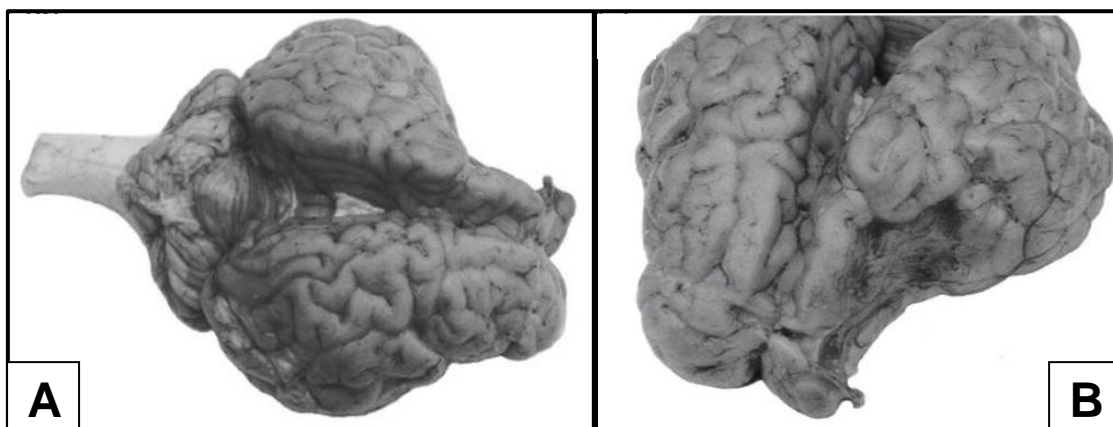


FIGURA 8 – Encéfalo de bovino. Infecção experimental por BoHV-5. A) Encéfalo, vista dorsal. Extensa área de atrofia no lobo frontal esquerdo. B) Encéfalo vista lateral e aproximada, evidenciando a intensa atrofia do córtex cerebral.

Fonte: SPILKI, 2011.

As alterações histopatológicas possuem intensidade variável a depender do local acometido. SALVADOR et al. (1998) encontraram alterações microscópicas em 21 bovinos, a meningite não supurativa difusa severa foi encontrada, principalmente nos lobos frontais, parietal e occipital. Já os manguitos perivascularares linfoplasmocitários foram mais comuns no tálamo, cerebelo, ponte e córtex occipital com predileção pela substância branca. Os corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos foram encontrados nos neurônios e astrócitos, em 18 dos 21 casos. Os principais sítios de localização desses foram os lobos frontal e parietal. Foram observadas áreas de malacia com presença de macrófagos espumosos, denominados células Gitter, no córtex mais superficial, ou na região submeningeana. Em algumas áreas o neurópilo era completamente substituído por células Gitter.

Conforme RISSI et al. (2006), todos os bovinos examinados tiveram alterações histopatológicas de meningoencefalite não supurativa. Em alguns casos foram encontrados malacia e alterações inflamatórias, como hiperemia, hemorragia e edema, tanto no neurópilo, quanto nas meninges. Em apenas quatro casos (21,05%) foram observados corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares em astrócitos e neurônios. Esses autores observaram alterações degenerativas caracterizadas por necrose neuronal ou neurônio vermelho (Figura 9A), neuronofagia, áreas de malacia infiltradas por células Gitter (Figura 9B), e nos casos mais crônicos, foram observados apenas macrófagos espumosos e alguns vasos (Figura 9C/D), características de lesão residual.

ELIAS et al. (2004) encontraram meningoencefalite não supurativa com malacia em todos os casos de bovinos naturalmente infectados. Os autores relataram que, nas áreas de malacia, o neurópilo foi substituído pelas células Gitter e em algumas áreas focais foram encontrados neurônios com citoplasma retraído e eosinofílico (necrose neuronal). Os autores observaram, ainda, que os corpúsculos de inclusão intranucleares estavam presentes em todos os casos e eram eosinofílicos. Já SPILKI et al. (2011) notaram apenas infiltração de células Gitter no córtex frontal e foco de malacia no gânglio trigêmeo, em bovinos experimentalmente infectados.

RISSI et al. (2008) observaram meningoencefalite em 18 casos do total de 22 bovinos e os corpúsculos de inclusão eosinofílicos foram encontrados em somente seis animais, nos núcleos de astrócitos e neurônios, enquanto as áreas de malacia foram vistas em 10 casos, inclusive em alguns animais apresentaram completa destruição do neurópilo. De acordo com COLODEL et al. (2002) há certa relação entre a reação inflamatória e a quantidade de corpúsculos de inclusão. Em quatro casos, onde a reação inflamatória foi discreta, foi encontrado apenas um corpúsculo de inclusão por campo. Já em cinco casos, onde o infiltrado foi moderado, foram observados dois corpúsculos de inclusão por campo. Em um caso, onde a reação foi acentuada, foram vistos mais de três inclusões virais.

Todavia, o diagnóstico diferencial, por métodos auxiliares, entre BoHV-5 e demais encefalites virais bovinas, deve ser realizado, visto que no exame histopatológico podem ocorrer resultados inconclusivos, quanto ao agente etiológico. Além disso, os sinais clínicos dessas enfermidades do SNC podem ser observados nas várias doenças inflamatórias do encéfalo de bovinos (CLAUS et al., 2007).



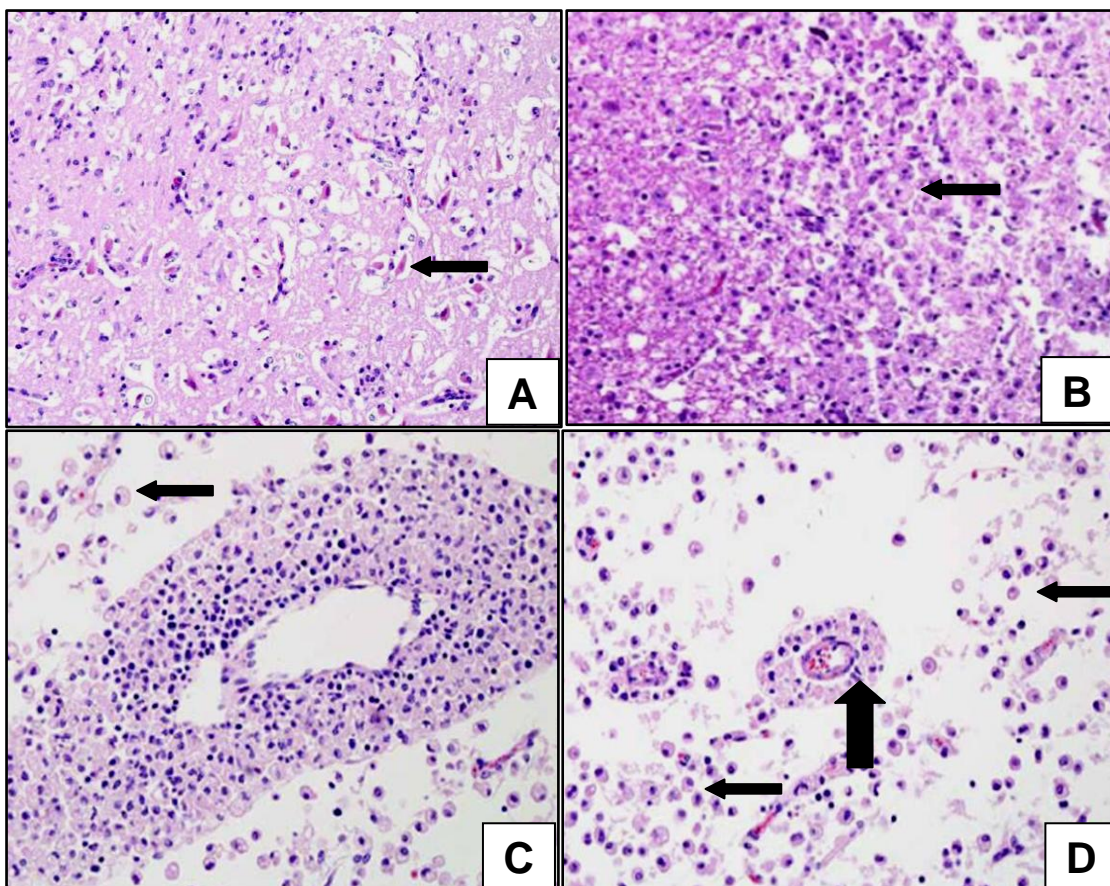


FIGURA 9 – Fotomicrografia de encéfalo bovino com infecção por herpesvírus bovino-5. A) Acentuada quantidade de neurônios vermelhos citoplasma angular, retraído e hipereosinofílico (seta), associado a isso núcleos picnóticos. HE, 10x. B) Área de malacia, com necrose neuronal, destruição do neurópilo e infiltração de células Gitter (seta). HE, 20x. C) Acentuado número de células Gitter (seta) ao redor de um vaso. HE, 20x. D) Todo o neurópilo foi removido, com moderada quantidade de células Gitter remanescentes (setas) e alguns vasos (seta larga). HE, 20x.  
Fonte: RECH, 2007.

#### 2.3.4 Técnicas complementares

Nos animais com sinais neurológicos de infecção pelo BoHV-5, pode ser realizado isolamento viral e depois identificação por anticorpos monoclonais, ou por métodos moleculares. Diversas técnicas moleculares têm sido empregadas em pesquisas e no diagnóstico da meningoencefalite por BoHV-5, dentre elas: a PCR (RISSI et al., 2008; ARRUDA et al., 2010; FONSECA JR et al., 2011), isolamento viral (CLAUS et al., 2007) e imunohistoquímica (HUBNER et al., 2005; CAGNINI, 2011).

CLAUS et al. (2007) avaliaram 47 amostras de SNC provenientes de surtos de doenças neurológicas em bovinos. Desse total, apenas 18 (38%), das amostras submetidas ao isolamento viral e à cultura celular em células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*), foi encontrado resultado positivo para herpesvírus bovino. Posteriormente, os autores detectaram o DNA do BoHV-5 nessas 18 amostras, utilizando multiplex PCR. DIALLO et al. (2011) empregaram a técnica de multiplex PCR em tempo real em amostras de 13 bovinos analisados para os vírus BoHV-5 e BoHV-1, e obtiveram resultados semelhantes entre a técnica de multiplex PCR convencional e multiplex PCR em tempo real.

FONSECA JR et al. (2011) utilizaram o método de PCR multiplex para detecção de DNA do BoHV-5, BoHV-1, herpesvírus ovino-2 (OHV-2) e herpesvírus suídeo-1 (SHV-1) em amostras do SNC de bovinos, ovinos e suínos. Para a espécie bovina foram avaliadas 65 amostras, mas somente dez foram positivas para BoHV-5, uma para BoHV-1 e cinco para OHV-2.

O diagnóstico molecular por PCR pode ser feito em amostras congeladas e a extração, também pode ser feita, do DNA viral em amostras do SNC conservadas em formol e emblocadas em parafina. O tempo de fixação do material pode promover uma interação química com ácidos nucleicos (SHI et al., 2004), diminuindo a sensibilidade da técnica. Além disso, deve ser considerado o estágio da doença, pois a quantidade de DNA viral na fase aguda é diferente da fase crônica, quando o vírus foi reativado (MEYER et al., 2001).

ARRUDA et al. (2010) analisaram 76 amostras de encéfalo bovino, dividindo-as em dois grupos distintos. Em um grupo foram alocadas 40 amostras com meningoencefalite necrosante, característica como infecção por BoHV-5, enquanto em outro grupo, foram avaliadas 36 amostras com meningoencefalite inespecífica. A partir da técnica de PCR, detectaram DNA de BoHV-5 em 16 (40%) amostras do grupo 1 e 12 (33,3%) do grupo 2. Os pesquisadores relataram, ainda, que em nove amostras do grupo 1, foram identificados corpúsculos de inclusão viral, e a confirmação foi detectada, pela presença do DNA viral em seis (66,6%). De modo semelhante, FERRARI et al. (2007) identificaram BoHV-5 em 15 amostras de encéfalo bovino, emblocadas em parafina, do total de 20 amostras analisadas.

A imunistoquímica é considerada também como uma ferramenta complementar no diagnóstico das infecções virais ocasionadas pelo BoHV-5. CAGNINI (2011) utilizou anticorpos monoclonais para avaliar diferentes porções do encéfalo de seis bezerros inoculados experimentalmente por BoHV-5. Foram encontradas, no mínimo, duas áreas com imunomarcagem em todos os animais. O total das áreas analisadas nesses seis animais foi de 108, onde 35 (32,4%) foram positivas. O referido autor relatou também que não foi encontrada diferença estatística das áreas positivas e negativas, do bulbo olfatório e córtex telencefálico em relação ao diencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e medula cervical.

HUBNER et al. (2005) analisaram encéfalo de dois bovinos pela técnica de imunistoquímica. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de oito anticorpos monoclonais para BoHV-5 com diferentes tipos de bloqueio da peroxidase endógena. Os resultados indicaram imunomarcações para o vírus nos dois animais, porém a intensidade de marcação variou de acordo com método de bloqueio, sendo que o leite em pó a 2,5% obteve maior intensidade de marcação quando comparado a caseína 0,5% e soro equino 2,5%.

## **2.4 Febre catarral maligna**

### **2.4.1 Etiopatogenia**

A febre catarral maligna (FCM) é uma doença infecciosa, viral, pansistêmica, fatal, com distribuição geográfica ampla. O “grupo de vírus” da FCM possui fita dupla de DNA e pertence ao gênero *Rhadinovirus* da família Gammaherpesvirinae (COULTER et al., 2001; GARMATZ et al., 2004). Foram identificados quatro vírus que causam FCM em animais. A forma africana (FCM gnu-associada) é induzida pela cepa alcelaphine herpesvírus 1 (AHV-1). Em locais onde não há gnus, ocorre a forma FCM ovino-associada, pois os ovinos são portadores do herpesvírus ovino-2 (OHV-2), sendo observada em ovinos e bovinos. Um terceiro vírus induz à FCM clássica em veado-da-cauda-branca (LI et al., 2000; CRAWFORD et al., 2002; LI et al., 2003).

Inúmeras hipóteses foram elaboradas na tentativa de explicar as lesões produzidas pelo vírus OHV-2, mas nenhuma forneceu dados convincentes que comprovassem as alterações encontradas (GAMARTZ, 2004). O estudo da patogênese do mouse herpesvírus-68 (MHV-68) foi relatado por NASH et al. (2001) que observaram, experimentalmente, a infecção por MHV-68 em camundongos. As cepas virais infectaram as células epiteliais pulmonares, através do ciclo lítico, e em seguida propagaram pela via respiratória. Essas partículas virais foram disseminadas e infectaram linfócitos B e macrófagos, o que foi considerado como estágio de latência. O ponto máximo de latência desse vírus no baço coincide com esplenomegalia seguida por uma doença semelhante à mononucleose ou doenças linfoproliferativas.

Em ovelhas, HUSSY et al. (2002), não detectaram o sítio primário de replicação viral. O DNA viral foi identificado, pela primeira vez, em leucócitos, um ou dois dias após a infecção da cavidade nasal e mucosa ocular. TAUS et al. (2005) inocularam OHV-2 em ovinos, experimentalmente, via aerossóis. A replicação viral no sítio da infecção também não foi relatada. Entretanto, um animal que recebeu maiores concentrações do vírus, demonstrou pico de DNA viral 4-6 dias após a inoculação em secreções nasais. Não foi possível concluir se esse pico foi devido à replicação ativa do vírus, ou da proliferação das partículas virais em estado de latência.

#### 2.4.2 Sinais clínicos

O período de incubação da FCM pode variar de 2 a 8 semanas, e a duração dos sinais clínicos pode ser de 1 a 15 dias. Na forma aguda os principais sinais são hipertemia, depressão, emagrecimento, lesões ulcerativas nas mucosas oral e nasal, salivação, corrimento nasal e ocular, opacidade de córnea e linfadenomegalia. Além disso, podem ser observados sinais neurológicos como incoordenação, emboletamento, tremores musculares e decúbito. Nos animais que apresentam a forma hiperaguda, podem ser observadas alterações hemorrágicas no sistema gastrointestinal. Com a cronicidade da enfermidade, os animais podem apresentar alterações no globo ocular que acarretam em

cegueira. Também podem ocorrer, alterações como panoftalmite bilateral e leucoma, as quais podem culminar em perfuração da córnea e prolapso da íris (RIET-CORREA, 2001).

#### 2.4.3 Diagnóstico anatomopatológico

As alterações macroscópicas, observadas na FCM, são relatadas em amostras oriundas de diversos estados brasileiros, como São Paulo (LUVIZOTTO et al., 2010), Rio Grande do Sul (GARMATZ et al., 2004; RECH et al., 2005), Paraíba (MACEDO et al., 2007) e Mato Grosso (MENDONÇA et al., 2008).

As principais alterações macroscópicas encontradas em animais com FCM, são lesões nos sistemas digestivo, respiratório superior e urinário, também são encontradas lesões no globo ocular. GARMATZ (2004), analisou a FCM em nove bovinos e no Quadro 1 são listadas as principais lesões provocadas pela FCM em bovinos. Foram observadas erosões e úlceras nos cornetos nasais, cavidade oral e abomaso. Também foram vistos, focos pálidos no rim, aumento no volume dos linfonodos, hemorragia e edema vesical, necrose de papilas linguais. A única alteração macroscópica observada no SNC foi de hiperemia das leptomeninges em três casos.

LUVIZOTTO et al. (2010) relataram um surto de FCM em bovinos, foram descritas lesões macroscópicas como opacidade de córnea em todos os animais examinados, aumento de volume nos linfonodos, baço e fígado, hemorragia e congestão pulmonar, áreas multifocais pálidas no rim e erosões e úlceras no esôfago e abomaso. Porém, não foram observadas lesões macroscópicas nos encéfalos desses animais.

QUADRO 1 – Principais alterações macroscópicas em 11 bovinos acometidos por febre catarral maligna (FCM). Os animais foram necropsiados nos surtos espontâneos ocorridos no Rio Grande do Sul, no período de 2001-2003.

Alteração (frequência)	Bovinos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	11	
Erosões/úlceras nos cornetos nasais (6/9)	•	•	•	•	•	o	o	o	•	
Erosões/úlceras na cavidade oral (3/9)	o	o	o	•	•	•	o	o	o	
Necrose das papilas bucais (3/9)	o	o	o	•	•	•	o	o	o	
Enfisema/edema pulmonar (4/9)	•	o	o	•	o	o	•	o	•	
Aumento de volume dos linfonodos (6/9)	o	o	o	•	•	•	•	•	•	
Erosões/úlceras no abomaso (7/9)	•	•	o	•	•	•	•	•	o	
Hemorragia/úlceras no intestino (4/9)	o	•	o	•	•	o	•	o	o	
Focos pálidos no rim (7/9)	•	o	•	•	•	•	•	o	•	
Hemorragia/edema na bexiga (6/9)	•	•	o	o	•	•	•	•	o	
Hiperemia da leptomeninge (3/9)	o	•	o	o	•	o	o	•	o	

• = presente; o = ausente. As necropsias dos bovinos 9 e 10 foram realizadas por veterinários de campo e as descrições das alterações macroscópicas são muito sumárias. Por essa razão esses dois bovinos foram excluídos da tabela.

Fonte: GARMATZ, 2004.

RECH et al. (2005) encontraram lesões macroscópicas de FCM em bovinos no Sul do Brasil. As principais lesões identificadas foram hiperemia, erosões e úlceras nos sistemas digestivo, respiratório, urinário e genital. Também foi muito frequente a opacidade de córnea e aumento no volume dos linfonodos.

Na avaliação microscópica, segundo MENDONÇA et al. (2008), as principais alterações foram: infiltrado inflamatório perivascular, degeneração fibrinóide da parede dos vasos, com necrose epitelial associado a infiltrado inflamatório (vasculite). No encéfalo a vasculite é discreta, sendo que o infiltrado inflamatório era composto por linfócitos e plasmócitos. Os infiltrados e a degeneração fibrinóide são vistos com maior frequência na substância branca. Entretanto, MACEDO et al. (2007), relataram que a vasculite e a degeneração fibrinóide difusa foram encontradas em maior quantidade nos vasos do encéfalo.

RECH et al. (2005) observaram vasculite associada à necrose fibrinóide (Figura 10 A e B), necrose epitelial e infiltrados inflamatórios em diversos órgãos, essas lesões vasculares foram observadas com maior frequência no SNC e no rim. GARMATZ (2004) observou que a intensidade das lesões vasculares variaram, desde discreto infiltrado linfocítico, na adventícia, até extenso comprometimento transmural. Essas lesões são comumente observadas em artérias e arteríolas dos rins, bexiga, cornetos nasais, encéfalo e *rete mirabile*.

ABABNEH et al. (2012) observaram infiltrado inflamatório linfocítico na região perivascular, no encéfalo de bovinos. Também visualizaram hiperplasia das placas de Peyer no intestino grosso, nefrite intersticial não-supurativa multifocal moderada e vasculite principalmente nos vasos do intestino e rim. Porém, esses autores relataram que o exame histopatológico pode ser prejudicado pelo acondicionamento das amostras do SNC.

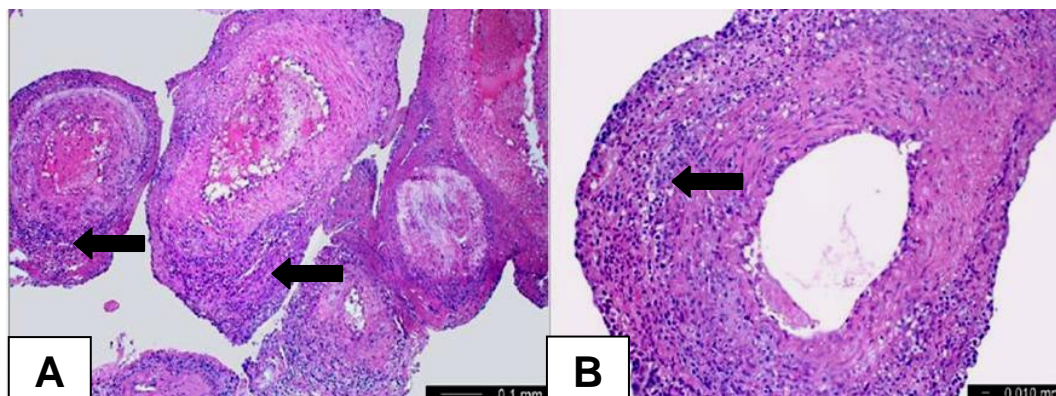


FIGURA 10 – Fotomicrografia de alterações histológicas em bovinos com febre catarral maligna. A) Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na parede das artérias (setas). HE, 10x. B) Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na parede das artérias da *rete mirabile*, associado à degeneração fibrinóide (seta). HE, 20x.

Fonte: GARMATZ, 2004.

#### 2.4.4 Técnicas complementares

Os sinais clínicos, associados às lesões macro e microscópicas, são fundamentais para o diagnóstico de FCM, porém faz-se necessário utilizar métodos auxiliares para detecção do agente etiológico. As principais técnicas utilizadas são PCR (GARMATZ et al., 2004; MENDONÇA et al., 2008; LUVIZOTTO et al., 2010; FONSECA JR et al., 2011; ABABNEH et al., 2012) e PCR de amostras emblocadas em parafina (CRAWFORD et al., 1999).

GARMATZ et al. (2004) encontraram dez casos positivos pela avaliação histológica, esses também foram positivos pela PCR. Em seis animais positivos na microscopia, não foram amplificados DNA viral. Os autores relataram que dois bovinos não foram positivos, tanto na histologia quanto, na PCR. No total de 71 amostras, que foram analisadas pela técnica de PCR, onde 18 foram positivas para OHV-2 e dessas, 16 com lesões microscópicas características de FCM.

LUVIZOTTO et al. (2010), por meio da PCR, relataram que amostras de todos os animais analisados foram positivas para glicoproteína B do vírus OHV-2, em surtos no estado do Mato Grosso. Utilizando a técnica de nested PCR, MENDONÇA et al. (2008) mostraram que nos quatro casos estudados, três amplificaram DNA para OHV-2 em amostras do SNC. Além disso, em um animal também houve amplificação do vírus em amostras do baço. Entretanto, ABABNEH et al. (2012), utilizaram amostras teciduais do linfonodo mesentérico de dois bovinos, com alterações histológicas de FCM e pelo método de nested PCR e conseguiram detectar o vírus OHV-2. FONSECA JR et al. (2011), utilizaram a técnica de multiplex PCR para identificar diferentes herpesvírus, no total de 65 amostras de encéfalo bovino, apenas cinco foram positivas para OHV-2.



A identificação do vírus também pode ser feita pela PCR, em material emblocado em parafina. CRAWFORD et al. (1999) relataram que em 20 animais saudáveis, sem lesões histológicas, não foram identificadas amostras positivas para OHV-2. Exame clínico e alterações histopatológicas, em 37 animais foram positivos para FCM, desse total 34 bovinos (92%) obtiveram amplificação para DNA viral de OHV-2. Os autores também demonstraram, que quanto maior o tempo de fixação das amostras em formol, diminui a possibilidade de identificação do agente viral.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais encefalites virais de bovinos, raiva, meningoencefalite por BoHV-5 e FCM podem ser observadas lesões macro e microscópicas no encéfalo de bovinos. As alterações macroscópicas, na maioria dessas doenças, são inespecíficas ou ausentes, porém na análise histopatológica podem ser visualizadas lesões características dessas enfermidades.

A visualização de corpúsculos de inclusão viral, nos casos de raiva e meningoencefalite por BoHV-5, são achados bastantes significativos e indicativos de qual doença representa o caso analisado. Para o patologista, esse tipo de alteração, em conjunto com histórico, exame clínico e achados de necropsia, são suficientes para estabelecer o possível diagnóstico da suspeita clínica.

A análise microscópica das lesões no SNC, depende do local de distribuição das lesões. A coleta adequada, sistemática do SNC de bovinos é feita por uma pequena percentagem de médicos veterinários, com isso, a maioria das amostras que são remetidas para o laboratório de patologia, não possuem todas as partes do SNC, para escolha do local onde encontra-se maior número de lesões.

Outra dificuldade é no acondicionamento das amostras, pois muitos requisitantes encaminham amostras armazenadas de formas inadequadas, além disso histórico com poucas informações que dificultam o rastreamento da possível doença do caso, bem como das técnicas complementares como IFD, PCR, isolamento viral e imunoistoquímica para confirmação do diagnóstico. Porém, os achados *post mortem* servem como triagem e reforçam a suspeita clínica.

A compreensão das principais alterações anatomopatológicas, bem como dos métodos auxiliares de diagnóstico, são importantes para o medico veterinário diferenciar e diagnosticar com mais precisão as principais enfermidades virais que acometem o SNC de bovinos.

## REFERÊNCIAS

1. ABABNEH, M. M.; HANANEH, W. M.; DALAB, A. E. S. Molecular and histopathological characterization of sheep-associated malignant catarrhal fever (SA-MCF) Outbreak in Beef Cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, 2012.
2. ALMOND, J.; PATTISON, J. Human BSE. **Nature**, London, v.389, p.437-438, 1997
3. ARAÚJO, D. B.; LANGONI, H.; ALMEIDA, M. F.; MEGID, J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC research notes**, v.1, n.17, p.1-6, 2008.
4. ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEMOS, R. A. A.; NOGUEIRA, A. P. A.; CRUZ, R. A. S.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M. Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.8, p. 646-650, 2010.
5. BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, n.2, p.125-144, 2007.
6. BARROS, C. S. L.; MARQUES, G. H. F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Defesa Animal, 2003.
7. BRASÍLIA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico**. Brasília, 104p, 2005.
8. CAGNINI, D. Q. **Avaliação histopatológica, imunoistoquímica e detecção molecular do DNA viral no sistema nervoso central de bovinos inoculados experimentalmente com o herpesvírus bovino 5**. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
9. CALLAN, R. J.; VAN METRE, D. C. Viral diseases of ruminant nervous system. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, Philadelphia, v.20, p.327-362, 2004.

10. CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.; WOSIACKI, S. R.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.128, p.183-188, 2005.
11. CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; MEDICI, K. C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A. Bovine herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and multiplex-pcr in central nervous system from cattle with neurological disease in brazilian herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.485-490, 2007.
12. COLODEL, E. M.; NAKASATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R. M.; SILVA, R. R. P.; SOUZA, M. A.; FILHO, J. A. O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Mrosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.293-298, 2002.
13. COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; AGUIAR, T. D. F.; ROLIM, B. N.; ROMIJN, P. C.; ROCHA, M. F. G. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.70, n.2, p.106-112, 2011.
14. COULTER, L. J.; WRIGHT, H.; REID, H. W. Molecular Genomic Characterization of the Viruses of Malignant Catarrhal Fever. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.124, p.2-19, 2001.
15. CRAWFORD, T. B.; LI, H.; O'TOOLE, D.; Diagnosis of malignant catarrhal fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.11, p.111-116, 1999.
16. CRAWFORD, T. B.; LI, H.; ROSENBERG, S. R.; NORHAUSEN, R. W.; GARNER, M. M. Mural folliculitis and alopecia caused by infection with goat-associated malignant catarrhal fever virus in two sika deer. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.221, n.6, p.843-847, 2002.
17. DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; McGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLET, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order herpesvirales. **Archives of Virology**, New York, v. 154, p. 171-177, 2009.
18. DE PAULA, R. R.; SOUZA, M. A.; COLODEL, E. M.; HÜBNER, S. O.; BRUM, K. B.; JORGE, P. H. C.; DAMASCENO, A. D. Meningomieloencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. In: 13º ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 2005, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte**, 2005.

19. DIALLO, I. S.; CORNEY, B. G.; RODWELL, B. J. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.175, p.46-52, 2011.
20. 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**, Rio de Janeiro, v.24, n.3, p.123-131, 2004.
21. EVANS, F. M. The polymerase chain reaction and pathology practice. **Diagnostic Histopathology**, Sussex, v.15, n.7, p.344-356, 2009.
22. FAIZEE, N.; HAILAT, N. Q.; ABABNEH, M. M. K.; HANANEH, W. M.; MUHADAIT, A. Pathological, immunological and molecular diagnosis of rabies in clinically suspected animals of different species using four detection techniques in Jordan. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, p.154-164, 2012.
23. FERNANDES, C. G. Raiva. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed. São Paulo:Varela, V. 1, p. 149-162, 2001.
24. FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T. C. Detection of bovine *Herpesvirus* type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.146, p.335-340, 2007.
25. FONSECA JR, A. A.; COSTA, E. A.; OLIVEIRA, T. S.; SALES, E. B.; SALES, M. L.; LEITE, R. C.; HENEIMANN, M. B.; REIS, J. K. P. PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.6, p. 1405-1413, 2011.
26. GALIZA, G. J. N.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F. M.; SIMOES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.3, p.267-276, 2010.
27. GARMATZ, S. L.; IRIGOYEN, L. F.; RECH, R. R.; BROWN, C. C.; ZHANG, J.; BARROS, C. S. L. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.93-106, 2004.

28. GARMATZ, S. L. **Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul**. 2004. 151p. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
29. HALFEN, D. C.; VIDOR, T. Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed. São Paulo:Varela, v.1, p. 97-107, 2001.
30. HUBNER, S. O.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SPILKI, F. R.; ROEHE, P. M. Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.1, p.1-6, 2005.
31. HUSSY, D.; JANETT, F.; ALBINI, S.; STAUBER, N.; THUN, R.; ACKERMANN, M. Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p.4700–4704. 2002.
32. LANGOHR, I. M. **Aspectos epidemiológicos e clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva**. 2001. 39p. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
33. LANGOHR, I. M.; IRIGOYEN, L. F.; LEMOS, R. A. A.; BARROS, C. S. L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.125-131, 2003.
34. LEMOS, R. A. A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil**. 2005. 149p. (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – São Paulo.
35. LI, H.; DYER, N.; KELLER, J.; CRAWFORD, T. B. Newly Recognized Herpesvirus Causing Malignant Catarrhal Fever in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.4, p.1313, 2000.
36. LI, H.; GAILBREATH, K.; BENDER, L. C.; WEST, K.; KELLER, J.; CRAWFORD, T. B. Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in muskox (*Ovibos moschatus*), nubian ibex (*Capra nubiana*), and gemsbok (*Oryx gazella*). **Journal of Wildlife Diseases**, Iowa, v.39, n.4, p. 875-880, 2003.

37. LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R. S.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, n.4, p.250-264, 2005.
38. LUVIZOTTO, M. C. R.; FERRARI, H. F.; CARDOSO, T. C. Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in young calves (*Bos indicus*): a case report. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.16, n.1, p.178-185, 2010.
39. MACEDO, J. T. S. A.; RIET-CORREA, F.; SIMOES, S. V. D.; DANTAS, A. F. M.; NOBRE, V. M. T. Febre catarral maligna em bovinos na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.27, n.7, p.277-281, 2007.
40. MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. Nervous System. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**, 5ª ed. Saunders, v.1, p. 314-490, 2007.
41. MENDONÇA, F. S.; DORIA, R. G. S.; SCHEIN, F. B.; FREITAS, S. H.; NAKASATO, L.; BOABAID, F. M.; PAULA, D. A. J.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M. Febre catarral maligna em bovinos no estado de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p.155-160, 2008.
42. MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of virology**, New York, v.146, p.633-652, 2001.
43. NANDI, S.; KUMAR, M. Global perspective of rabies and rabies related viruses: a comprehensive review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.6, n.2, p.101-116, 2011.
44. NASH, A. A.; DUTIA, B. M.; STEWART, J. P.; DAVISON, A. J. Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. **Philosophical Transactions of Royal Society Biological Science**, London, v.356, p.569-579, 2001.
45. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Internacional Animal Health Code. Diagnostics & vaccines. Manual of standards. Chapter 2.1.13 – Rabies. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.13\\_RA\\_BIES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RA_BIES.pdf). Acesso em: 12 set. 2011.

46. OLIVEIRA, T. S.; BULL, V.; REZENDE, C. A.; FURTINI, R.; COSTA, E. A.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Perfil das amostras do sistema nervoso central de bovinos com síndrome neurológica e diagnóstico da raiva bovina no serviço de defesa sanitária de Minas Gerais, 2003-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n.4, p.333-339, 2012.
47. PEDROSO, P. M. O. **Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros**. 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
48. PEDROSO, P. M. O.; COLODEL, E. M.; PESCADOR, C. A.; ARRUDA, L. P.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.11, p.899-904, 2009.
49. QUEIROZ, L. H.; CARVALHO, C.; BUSO, S. D.; FERRARI, C. I. L.; PEDRO, W. A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.42, n.1, p.9-14, 2009.
50. RECH, R. R.; SCHILD, A. L.; DRIEMEIER, D.; GARMATZ, S. L.; OLIVEIRA, F. N.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C. S. L. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.97-105, 2005.
51. RECH, R. R. **Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis**. 2007. 170p. (Doutorado em Patologia Veterinária) – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
52. RIET-CORREA, F. Febre catarral maligna. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed. São Paulo:Varela, v.1, p.93-97, 2001.
53. RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A. L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.4, p.161-168, 2002.
54. RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; CERQUEIRA, V. D.; BRITO, M. F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n.1, p.44-46, 2006.



55. RISSI, D. R.; OLIVEIRA, F. N.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R. A. A.; BARROS, C. S. L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.123-132, 2006.
56. RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M. S.; FLORES, E. F.; BARROS, C. S. L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.20, p.346-349, 2008.
57. RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J. C.; LUCENA, R. B.; CARMO, P. M. S.; BARROS, C. S. L. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.11, p.958-967, 2010.
58. ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family *Herpesviridae*: an update. **Archives of Virology**, New York, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.
59. ROJAS, A. E.; LOZA-RUBIO, E.; BANDA, R. V. M.; HERNANDEZ, B. E. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.18, p.98-101, 2006.
60. SALVADOR, C. S.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Meningoencefalite em bovinos causada por bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.76-83, 1998.
61. SANCHES, A. W. D.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.113-118, 2000.
62. SANTOS, M. F. C.; RESENDE, R. M.; SOBRINHO, R. N.; VIEIRA, S. Diagnóstico laboratorial da raiva no Estado de Goiás no período de 1976 a 2001. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, n.1, p.77-83, 2006.
63. SHI, S. R.; DATAR, R.; LIU, C.; WU, L.; ZHANG, Z.; COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v.122, p.211-218, 2004.

64. SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.27, n.10, p.403-408, 2007.
65. SPILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P. M. Cortical necrosis and cerebral atrophy in calves experimentally infected with bovine herpesvirus type 5. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v.39, n.1, p.953, 2011.
66. STEIN, L. T.; RECH, R. R.; HARRISON, L.; BROWN, C. C. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. **Veterinary Pathology**, Washington, v.47, n.4, p.630-636, 2010.
67. TAUS, N. S.; TRAU, D. L.; OAKS, J. L.; CRAWFORD, T. B.; LEWIS, G. S.; LI, H. Experimental infection of sheep with ovine herpesvirus 2 via aerosolization of nasal secretions. **Journal of General Virology**, London, v.86, p.575–579, 2005.
68. TEIXEIRA, T. F.; HOLZ, C. L.; CAIXETA, S. P. M. B.; DEZEN, D.; CIBULSKI, S. P.; SILVA, J. R.; ROSA, J. C. A.; SCHMIDT, E.; FERREIRA, J. C.; BATISTA, H. B. C. R.; CALDAS, E.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul, Brasil, de 1985 a 2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28, n.10, p.515-520, 2008.