

Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica¹

Laura P. Arruda^{2*}, Luciano Nakazato³, Valéria Dutra³, Ricardo A.A. Lemos⁴, Ana P.A. Nogueira⁵, Raquel A.S. Cruz³, Caroline A. Pescador³ e Edson M. Colodel³

ABSTRACT. - Arruda L.P., Nakazato L., Dutra V., Lemos R.A.A., Nogueira A.P.A., Cruz R.A.S., Pescador C.A. & Colodel E.M. 2010. [Molecular detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from cattle with neurological disease.] 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* 30(8):646-650. Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa s/n, Bairro Coxipó, Cuiabá, MT 78068-900, Brazil. E-mail: laura.peixoto@gmail.com

Bovine herpesvirus (BoHV) is an important cause of neurological disease in cattle in the Midwest Brazil. The application of molecular diagnostic techniques represents an important contribution for the study of BoHV. This paper describes the detection of BoHV-5 and BoHV-1 by a specific multiplex PCR assay in 76 paraffin-embedded samples from central nervous system (CNS) of cattle with neurological disorders. The samples were divided into 2 groups according to the histological features: Group 1 was composed of 40 cases of necrotizing meningoencephalitis (characteristic of BoHV infection), and Group 2 was composed of 36 cases of nonspecific nonsuppurative meningoencephalitis. Positive results for BoHV-5 accounted for 40% of the samples in the group 1 and 33% in the group 2. No detection of BoHV-1 was recorded.

INDEX TERMS: Bovine herpesvirus, BoHV-1, BoHV-5, PCR.

RESUMO. - A infecção por herpesvírus bovino (BoHV) é uma das principais causas de doença neurológica em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. O uso de técnicas moleculares de diagnóstico representa uma contribuição importante para o estudo dessa doença. Este trabalho descreve o uso de uma técnica específica de PCR multiplex para

identificar BoHV-5 e BoHV-1 em 76 amostras de encéfalo de bovinos fixadas em formol e incluídas em parafina. Com base nas alterações histológicas, as amostras foram separadas em 2 grupos: o Grupo 1 era composto de 40 amostras de bovinos com meningoencefalite necrosante característica da infecção por BoHV; no Grupo 2 estavam 36 amostras de casos com encefalite não-supurativa inespecífica. Identificação de BoHV-5 foi constatada em 40% das amostras do grupo 1 e em 33% das amostras do grupo 2. Não houve amplificação de DNA de BoHV-1 em nenhuma amostra.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvírus bovino, BoHV-1, BoHV-5, PCR.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios do sistema nervoso central (SNC) de bovinos abrangem um grupo de enfermidades importantes que incluem principalmente doenças infecciosas e degenerativas (Riet-Correa et al. 2002). A identificação, em meados da década de 1980, da encefalopatia espongiiforme bovina

¹ Recebido em 13 de novembro de 2009.

Aceito para publicação em 10 de abril de 2010.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Av. Fernando Corrêa da Costa s/n, Bairro Coxipó, Cuiabá, MT 78068-900, Brasil. *Autor para correspondência: laura.peixoto@gmail.com

³ Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UFMT, Cuiabá, MT. E-mail: moleta@ufmt.br

⁴ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Cx. Postal 649, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil.

⁵ Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais e Análises de Alimentos, Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul, Rua Senador Filinto Müller 1146, Campo Grande, MS 79074-902.

(BSE) e a sua posterior ligação com a variante da doença humana de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) realçou a importância sócio-econômica e de saúde pública das doenças do SNC nessa espécie (Barros et al. 2006).

As principais enfermidades inflamatórias que afetam o SNC de bovinos no Brasil são a raiva, a meningoencefalite por herpesvírus bovino (BoHV) e a febre catarral maligna (FCM) (Barros et al. 2006, Sanches et al. 2000, Mendonça et al. 2008). A meningoencefalite por BoHV é uma das doenças mais importantes de bovinos na região Centro-Oeste do Brasil (Salvador et al. 1998, Colodel et al. 2002, De Paula et al. 2005,) e tem sido relatada em vários outros Estados, como São Paulo (Salvador et al. 1998), Minas Gerais (Gomes et al. 2002), Rio Grande do Sul (Rissi et al. 2006, Silva et al. 2007a,b), Pará (Riet-Correa et al. 2006) e Paraná (Claus et al. 2007). A infecção por BoHV-5 é usualmente associada com quadro de meningoencefalite e sinais clínicos neurológicos. O BoHV-1 é o agente causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e da vulvovaginite pustular infecciosa bovina (IPV) (Roizman et al. 1992). Entretanto, estudos têm demonstrado que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 podem não estar estritamente associados às suas respectivas síndromes clínicas, causando também quadros clínicos classicamente atribuídos ao outro tipo viral (Silva et al. 2007a). A similaridade entre os dois vírus e a dificuldade na diferenciação sorológica não permitiam que um levantamento adequado da prevalência dessas infecções fosse realizado (Roehle et al. 1998). Diversos estudos têm proposto a utilização de técnicas moleculares para auxiliar na diferenciação entre BoHV-5 e BoHV-1. Os testes mais utilizados são o PCR e o *nested*-PCR (Ely et al. 1996, Ashbaugh et al. 1997, Claus et al. 2005, Silva et al. 2007a,b). Esses testes são específicos e práticos e têm a vantagem de permitir o estudo retrospectivo a partir de amostras incluídas em parafina. Outras técnicas, como a imuno-histoquímica (Meyer et al. 2001, Vogel et al. 2003, Hübner et al. 2005), o cultivo celular (Souza et al. 2002) e a análise de restrição enzimática (D'Arce et al. 2002) também podem ser utilizadas como ferramenta diagnóstica.

Neste trabalho demonstraremos uma técnica para detecção molecular de BoHV-5 e BoHV-1 em amostras de encéfalo fixadas em formol e emblocadas em parafina. Todas as amostras eram provenientes de bovinos com doença neurológica e foram remetidas ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (LPV-UFMT) entre 1999 e 2008.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de encéfalo de bovinos com quadro clínico neurológico coletadas por veterinários autônomos e veterinários do Instituto de Defesa Agropecuária do Mato Grosso (INDEA-MT) e encaminhadas ao LPV-UFMT entre 1999 e 2008 foram analisadas. Essas amostras foram negativas para raiva no teste de imunofluorescência direta e na prova biológica. Desse grupo foram selecionadas 76 amostras que foram recebidas pelo LPV-UFMT em solução de formalina a 10%. Dessas, 9 amostras

tinham também fragmentos que foram mantidos congelados. Não é possível afirmar com precisão o período em que os materiais permaneceram em solução de formalina, estimando-se variações de dias até pouco mais de um ano. As 76 amostras de encéfalo enviadas foram processadas por métodos convencionais para análise histológica e coradas pela hematoxilina-eosina. As amostras foram classificadas em dois grupos distintos. O Grupo 1 era composto de amostras com diagnóstico de meningoencefalite necrosante não-supurativa associada ao BoHV-5 (40 amostras). Nesses casos havia infiltrado inflamatório mononuclear perivascular, áreas multifocais de malacia com gliose, células gitter e ocasionalmente corpúsculos de inclusão intranucleares em astrócitos e/ou neurônios (9 amostras ou 22,5%). O Grupo 2 continha amostras com diagnóstico de meningoencefalite não-supurativa inespecífica (36 casos). Nesses casos havia apenas variável intensidade de infiltrado inflamatório mononuclear perivascular.

As amostras de encéfalo pertencentes aos dois grupos foram submetidas à PCR para detecção de BoHV-1 e BoHV-5 (Claus et al. 2005). Preferencialmente fragmentos de regiões do córtex telencefálico, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo foram encaminhados para análise molecular, priorizando-se secções onde se notavam alterações microscópicas mais características e evidentes. Apenas fragmentos de medula oblonga e cerebelo estavam disponíveis em 16 amostras. A extração de DNA foi obtida de amostras incluídas em parafina ou de material fresco congelado por método utilizando fenol-clorofórmio (Sambrook et al. 1989) modificado. Os *primers* utilizados que codificam a glicoproteína C (gC) foram B1, específico para BoHV-1 (5-CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC-3 nt. 185-204), B5, para BoHV-5 (5-CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3nt. 322-339) e Bcon, *primer* consenso [5-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG 3nt. 519-538 (BoHV-1) e nt. 461-480 (BoHV-5)], amplificando um produto de 354pb para BoHV-1 e 159pb para BoHV-5. A leitura foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador (UV-300nm). Controles negativos e positivos para BoHV-1 e BoHV-5 foram inseridos em cada PCR. Para controle positivo foi utilizado DNA proveniente dos isolados SV-56/90 de BoHV-1 e SV-507/99 de BoHV-5 (Silva et al. 2007a). Esse material foi obtido no Setor de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria.

Testaram-se também 30 amostras de encéfalo bovino obtidas em abatedouro com Inspeção Federal (SIF 585) sem alterações macro e microscópicas. Fragmentos desses encéfalos foram mantidos sobre refrigeração e em solução de formalina a 10% por 15 dias e depois foram processados por técnicas rotineiras para estudo histológico. Adicionalmente, de 11 bovinos deste grupo, coletaram-se amostras dos gânglios de Gasser. Parte de cada gânglio foi refrigerada e parte foi mantida em solução de formalina a 10%.

RESULTADOS

De um total de 402 amostras de encéfalo de bovinos com doença neurológica encaminhadas ao LPV-UFMT entre 1999 e 2008 e que foram negativas para raiva, 76 (18,9%) foram classificadas dentro dos dois grupos propostos para este trabalho. Desse total, 40 amostras (52,6%) tinham diagnóstico de meningoencefalite necrosante com características de infecção por BoHV-5 (Grupo 1) e 36 (47,3%) tinham diag-

nóstico de meningoencefalite não-supurativa inespecífica (Grupo 2). Não houve amplificação de BoHV-1 em nenhuma das amostras (seja incluídas em parafina ou congeladas). Identificação de DNA de BoHV-5 foi positiva em 16 (40%) amostras do Grupo 1 e em 12 (33,3%) do Grupo 2. DNA de BoHV-5 foi identificado em 6 (66,6%) das 9 amostras do Grupo 1 com inclusões intranucleares em astrócitos e neurônios. Nas 9 amostras que também estavam congeladas (seis do Grupo 1 e três do Grupo 2), identificou-se DNA de BoHV-5 em quatro amostras do Grupo 1 e em duas do Grupo 2. Das mesmas amostras correspondentes em parafina, apenas duas do Grupo 1 e uma do Grupo 2 foram positivas, mostrando um decréscimo de 50% na positividade. Houve diminuição da positividade principalmente nas amostras em que se estimou permanência em solução de formalina a 10% por períodos maiores de 40 dias.

Dos materiais obtidos em frigorífico, uma amostra congelada de gânglio de Gasser amplificou DNA de BoHV-5 e as demais foram negativas tanto para BoHV-5 como para BoHV-1.

DISCUSSÃO

O DNA de BoHV-5 foi detectado pela técnica de PCR em 40% das amostras do Grupo 1 e esse percentual subiu para 66% nas amostras que tinham corpúsculos de inclusão intranucleares em astrócitos e neurônios. DNA de BoHV-5 foi detectado em 33,3% das amostras do Grupo 2, demonstrando a importância do emprego dessa técnica como auxiliar no diagnóstico da infecção por BoHV em bovinos com quadro clínico de doença neurológica.

Ferrari et al. (2007) detectaram 75% de positividade na PCR para BoHV-5 em amostras de encéfalos com meningoencefalite necrosante que permaneceram em média uma semana em formalina tamponada a 10%. Em um estudo retrospectivo realizado por Ely et al. (1996), de 32 casos classificados histologicamente como meningoencefalite não-supurativa e negativos para raiva, apenas 7 (21,8%) amostras foram positivas para BoHV-5 e uma (3,2%) para BoHV-1 utilizando PCR em amostras incluídas em parafina. As outras 24 amostras permaneceram sem diagnóstico. Em nosso trabalho, possivelmente o tempo em que as amostras permaneceram em solução de formalina a 10% limitou a amplificação do DNA viral em casos onde as alterações morfológicas eram características da infecção por BoHV. Em termos práticos notamos que a positividade foi maior em amostras que permaneceram por menos de 40 dias em solução de formol. Dentre 18 amostras que foram incluídas com menos de 40 dias, 12 (66,6%) amplificaram DNA de BoHV-5. Dentre 7 amostras que permaneceram mais de um ano em formol, apenas 2 (28,5%) amplificaram DNA viral. O tempo de fixação causa degradação do DNA e compromete o resultado da análise (Karlsen et al. 1994). Em investigações moleculares do herpesvírus associado com a FCM, a causa de resultados negativos, mesmo em bovinos com alterações clínicas e patológicas características da doença, foi creditada ao tempo prolongado de fixação em formol (Crawford et al. 1999, Garmatz et al. 2004).

A influência da conservação em solução de formol também pode ser avaliada ao se comparar as amostras fixadas em formalina em relação às congeladas. Neste trabalho, amostras que foram positivas quando congeladas não amplificaram DNA de BoHV-5 após fixação em formol e infiltração com parafina. Outros fatores que podem causar a ocorrência de resultados negativos e que, portanto devem ser minimizados na realização desta técnica, seriam quantidades insuficientes de DNA viral no tecido, falhas na extração do DNA e ausência do DNA. Essas divergências poderiam ser minimizadas com a amplificação de genes *housekeeping*, como desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH), succinato desidrogenase flavoproteína subunidade A (SDHA) ou citocromo b mitocondrial (Cytb) (Goossens et al. 2005, Taylor et al. 2007), que serviriam como um controle da qualidade do DNA obtido, sendo uma importante alternativa para melhoria na identificação molecular em material conservado em formol.

Morfologicamente, meningoencefalite não-supurativa com áreas de necrose nas porções rostrais do encéfalo são alterações que sugerem infecção por BoHV (Rissi et al. 2006). Adicionalmente, inclusões basofílicas intranucleares em astrócitos são achados que caracterizam essa infecção (Elias et al. 2004). No entanto, estudos de cepas de BoHV-5 com diferentes graus de neurovirulência podem determinar padrões morfológicos distintos de lesões (Flores et al. 2009) e BoHV-5 e BoHV-1 foram isolados em casos onde não se observam alterações no encéfalo dos bovinos afetados (Silva et al. 2007b, Rissi et al. 2008). Meningoencefalite não-supurativa inespecífica é frequentemente encontrada em bovinos no LPV-UFMT (Ubiali et al. 2008). Essa alteração não mostra características morfológicas compatíveis com doenças de causas já conhecidas e, portanto, fica sem diagnóstico final. Essa lesão é por vezes encontrada em bovinos sem manifestação clínica neurológica, incluindo amostras obtidas em frigoríficos. No presente estudo, todas as amostras do Grupo 2 eram de bovinos que tinham no histórico sinais clínicos de distúrbios no SNC e em 33,3% das amostras havia DNA de BoHV-5, podendo portanto se associar o quadro clínico com as lesões induzidas pela infecção por BoHV-5. A ausência de amplificação de BoHV-5 em 77% das amostras pode ter ocorrido devido às amostras serem negativas ou falso-negativas (devido ao local de coleta não ser apropriado). A coleta e encaminhamento de amostras de locais pertinentes são importantes para confiabilidade diagnóstica dos resultados. Trabalhos em bovinos infectados experimentalmente por BoHV-5 demonstram que o vírus encontra-se na maioria dos casos presente no córtex frontal, gânglio de Gasser, mesencéfalo e tálamo (Vogel et al. 2003) e as lesões são mais proeminentes nas porções rostrais de encéfalo (Rissi et al. 2006). Portanto essas áreas devem ser adequadamente coletadas para análise diagnóstica. Dentre as 36 amostras do Grupo 2, 12 foram encaminhadas ao laboratório sem as partes pertinentes, impedindo a análise histológica de locais onde as lesões são mais constantes. Também é necessário diferenciar as amostras com

meningoencefalite não-purulenta inespecífica que podem estar associadas com outras doenças virais que acomete SNC de bovinos, principalmente pela infecção pelos vírus da raiva e FCM. Neste estudo, as amostras foram testadas para raiva pelos métodos de imunofluorescência direta e prova biológica, resultando negativas. Sabe-se que em alguns casos de raiva podem também ocorrer resultados discrepantes entre as duas provas laboratoriais de eleição (Peixoto et al. 2000, Lemos 2005) e, dependendo das amostras analisadas, ambas podem ser negativas (Silva et al. 1974). A vasculite é a principal alteração em casos de FCM, porém infiltrado perivascular mononuclear são achados no encéfalo de bovinos com essa doença. A intensidade dessas lesões varia no SNC de acordo com a região anatômica afetada e é encontrada com mais frequência e intensidade nos vasos da *rete mirabile* carotídea e leptomeninges, e com menor intensidade na substância branca do encéfalo (Garmatz 2004).

Das amostras obtidas em frigorífico, uma amplificou DNA de BoHV-5, possivelmente de vírus latente (Vogel et al. 2003). Isso indica a importância de associar as técnicas de caracterização etiológica com a observação de alterações morfológicas para complementação diagnóstica.

A importância do BoHV-1 na ocorrência de doenças de bovinos no Estado de Mato Grosso é desconhecida. Meningoencefalite associada ao BoHV-1 foi observada por Silva et al. (2007a) em diferentes Estados. Dentre 26 amostras isoladas de doença neurológica, cinco (19,3%) eram por BoHV-1. A utilização de um método molecular para detectar simultaneamente BoHV-1 e BoHV-5 facilita esse tipo de levantamento. No presente estudo, todas as amostras testadas foram negativas para BoHV-1.

Existem vários métodos de detecção de BoHV-5. Dentre eles, os mais usados são imuno-histoquímica, PCR e isolamento viral. Entretanto, fatores como intensidade e distribuição de lesões, autólise e tempo de fixação em formol são variáveis importantes a serem levadas em consideração para que se tenha sucesso no diagnóstico (Karlsen et al. 1994, Ely et al. 1996).

Agradecimentos.- Ao Prof. Dr. Rudi Weiblen e à Dra. Mariana Sá e Silva, do Setor de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela disponibilização de isolados virais controles positivos para BoHV-1 e BoHV-5 utilizados (SV-56/90 e SV-507/99). Ao Laboratório de Apoio à Saúde Animal (LASA) do Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso (INDEA-MT), pelo encaminhamento de amostras negativas para raiva, para este estudo. Ao Prof. Dr. David Driemeier, do Departamento de Patologia Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, pela disponibilização de dados de amostras de Mato Grosso negativas para raiva e pertencentes ao Programa Nacional de Vigilância de Encefalopatia Espongiformes transmissíveis. À Danielle A. das Neves e Veronique M.C.L. Cortada, pela contribuição a este trabalho com o encaminhamento de amostras e informações epidemiológicas. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, pela concessão da bolsa de capacitação.

REFERÊNCIAS

Ashbaugh S.E., Thompson K.E., Belknap E.B., Schultheiss P.C., Chowdhury S. & Collins J.K. 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:387-394.

Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Doenças do Sistema Nervoso de Novinos no Brasil. Vallée, Montes Claros, MG.

Claus M.P., Alfieri A.F., Flatschart A.V.F., Wosiacki S.R., Medici K.C. & Alfieri A.A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods* 128:183-188.

Claus M.P., Alfieri A.F., Medici K.C., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2007. 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. *Braz. J. Microbiol.* 38:485-490.

Colodel E.M., Nakazato L., Weiblen R., Mello R.M., Silva R.R.P., Souza M.A., Oliveira J.A.F. & Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante causada por bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural* 32(2):293-298.

Crawford T.B., Li H. & O'Toole D. 1999. Diagnosis of malignant catarrhal fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:111-116.

D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F.R., Roehe P.M. & Arns C.W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88(4):315-324.

De Paula R.R., Souza M.A., Colodel E.M., Hübner S.O., Brum K.B., Jorge P.H.C. & Damasceno A.D. 2005. Meningomieloencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. *Anais 13º Enapave, Belo Horizonte, MG, p.2. (Resumo)*

Elias F., Schild A.L. & Riet-Correa F. 2004. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq. Vet. Bras.* 24(3):123-131.

Ely R.W., d'Offay J.M., Ruefer A.H. & Cash C.Y. 1996. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:487-492.

Ferrari H.F., Luvizotto M.C.R., Rahal P. & Cardoso T.C. 2007. 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. *J. Virol. Methods* 146:335-340.

Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Dezengrini R., Almeida S.R., Spilki F.R. & Roehe P.M. 2009. Neuropatogênese experimental da infecção pelo bovino tipo 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 29(1):1-16.

Garmatz S.L. 2004. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 151p.

Garmatz S.L., Irigoyen L.F., Rech R.R., Brown C.C., Zhang J. & Barros C.S.L. 2004. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. *Pesq. Vet. Bras.* 24(2):93-106.

Gomes L.I., Rocha M.A., Costa E.A., Lobato Z.I.P., Mendes L.C.N., Borges A.S., Leite R.C. & Barbosa-Stancioli E.F. 2002. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54(2):217-220.

Goossens K., Poucke M.V., Soom A.V., Vandesompele J., Zevenen A.V., Peelman L.J. 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev. Biol.* 2005, 5:27.

Hübner S.O., Pescador C., Corbellini L.G., Driemeier D., Spilki F.R. & Roehe P.M. 2005. Otimização da imunoistoquímica para detecção de bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57(1):1-6.

Karlsen F., Kalantari M., Chitemerere M., Johansson B. & Hagmar B. 1994. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab. Invest.* 71(4):604-611.

Lemos R.A.A. 2005. Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 155p.

- Mendonça F.S., Dória R.G.S., Schein F.B., Freitas S.H., Nakazato L., Boabaid F.M., Paula D.A.J., Dutra V. & Colodel E.M. 2008. Febre catarral maligna em bovinos no Estado de Mato Grosso. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):155-160.
- Meyer G., Lemaire M., Ros C., Belak K., Gabriel A., Cassart D., Coignoul F., Belak S. & Thiry E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol.* 146:633-652.
- Peixoto Z.M.P., Cunha E.M.S., Sacramento D.R.V., Conceição M., Souza A.M., Silva L.H.Q., Germano P.L., Kroeff S.S. & Kotait I. 2000. Rabies laboratory diagnosis: Peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.* 31(1):72-75.
- Riet-Correa F., Riet-Correa G. & Schild A.L. 2002. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e equídeos. *Pesq. Vet. Bras.* 22(4):161-168.
- Riet-Correa G., Duarte M.D., Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Cerqueira V.D., Brito M.F. & Riet-Correa F. 2006. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1):44-46.
- Rissi D.R., Oliveira F.N., Rech R.R., Pierezan F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.* 26:123-132.
- Rissi D.R., Pierezan F., Silva M.S., Flores E.F. & Barros C.S.L. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:346-349.
- Roehe P.M., Teixeira M.F.B. & Almeida R.S. 1998. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. *Anais Simpósio Internacional sobre Bovino (Tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)*, Santa Maria, RS, p.89-96.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family herpesviridae: An update. *Archs Virology* 28(1):1-7.
- Salvador C.S., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M. & Osório A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18(2):76-83.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20:113-118.
- Silva R.A., Silva N.M. & Meneses P.R.V. 1974. Ocorrência do vírus da raiva na medula e bulbo de equinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. *Pesq. Agropec. Bras., Sér.Vet.* 9:29-31.
- Silva M.S., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2007a. Identificação e diferenciação de bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesq. Vet. Bras.* 27(10):403-408.
- Silva M.S., Brum M.C.S., Loreto E.L., Weiblen R. & Flores E.F. 2007b. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.* 129:191-199.
- Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S., Gonçalves D.A., Schaefer R., Silva T.C., Almeida R.S., Vicentini F., Franco A.C., Oliveira E.A., Spilki F.R., Weiblen R., Flores E.F., Lemos R.A.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehe P.M. 2002. Caracterização de bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 22:13-18.
- Taylor G.M., Worth D.R., Palmer S., Jahans K. & Hewinson R.G. 2007. Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet. Res.* 2007, 3:12.
- Ubiali D.G., Caldeira F.H.B., Moraes L.G., Neto W.S.P., Antoniassi N.A.B., Arruda L.P., Souza M.A. & Colodel E.M. 2008. Causas de enfermidades com sinais clínicos nervosos em bovinos no Estado de Mato Grosso entre janeiro de 2005 e abril de 2008 diagnosticadas no LPV-UFMT. *Anais Endivet, Campo Grande, MS*, p.261-262. (Resumo)
- Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V. & Bastos R.G., 2003. Distribution of Bovine Herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently experimentally.