



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DE HERPESVIRUS OVINO TIPO 2 (OVHV-2) POR *NESTED* REACÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (nPCR) EM OVINOS DO DISTRITO FEDERAL E
ENTORNO**

RÔMULO SANTOS ADJUTO ELOI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

JANEIRO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DE HERPESVIRUS OVINO TIPO 2 (OVHV-2) POR *NESTED* REACÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (nPCR) EM OVINOS DO DISTRITO FEDERAL E
ENTORNO**

RÔMULO SANTOS ADJUTO ELOI

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 075/2013

BRASÍLIA/DF

JANEIRO/2013

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ELOI, R. S. A. **DETECÇÃO DE HERPESVIRUS OVINO TIPO 2 (OvHV-2) POR NESTED REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (nPCR) EM OVINOS NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 27 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Eloi, Rômulo Santos Adjuto

Detecção de *Herpevirus* Ovino tipo 2 (OvHV-2) por *Nested* Reação em Cadeia da Polimerase (nPCR) em ovinos do Distrito Federal e entorno. / Rômulo Santos Adjuto Eloi orientação de Márcio Botelho de Castro – Brasília, 2013. 27 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. *Herpesvirus ovino* tipo 2. 2. Ovinos. 3. Meningoencefalite. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. 5. Febre catarral maligna. ELOI, R. S. A. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

DETECÇÃO DE HERPESVIRUS OVINO TIPO 2 (OvHV-2) POR *NESTED* REACÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (nPCR) EM OVINOS NO DISTRITO FEDERAL E
ENTORNO

RÔMULO SANTOS ADJUTO ELOI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADO POR:

Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro (Universidade de Brasília)

Prof. Dra. Giane Regina Paludo (Universidade de Brasília)

Dr. Alessandro Pecego Martins Romano

Brasília, 29 de Janeiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua graça, amor, dedicação, simplicidade, amizade, alegria e grandiosidade, estando presente sempre em toda minha vida, desde o meu primeiro respiro neste mundo até as futuras bênçãos reservadas por ele para o meu futuro.

Ao Meu pai e mestre, José Francisco Eloi, símbolo de dedicação, luta, companheirismo, por toda a minha vida, ensinando que toda batalha há como ser vencida por mais difícil que ela apresente-se. Nós sabemos que não foi fácil, porém o senhor nunca se entregou antes de tentar todas as formas a resolução destas dificuldades impostas pela vida. Obrigado por ter sido meu companheiro em todas as madrugadas, durante a peregrinação para o transporte escolar, sendo muitas vezes feito a pé durante a chuva. Papai eu te amo.

Declaro aqui, a minha mãe e rainha, Maria Amália Santos Adjuto, todo o meu imenso amor por esta pessoa que me gerou em seu leito sagrado, me dando todo amor, carinho, felicidade que um filho possa querer. Obrigado por cada madrugada que a senhora acordou para que eu não saísse de casa sem meu café da manhã, sendo sempre carinhosa e dedicada a cada manhã. Muitas vezes antes de agir como mãe, a senhora foi minha amiga com quem pude sempre contar minhas conquistas, sucesso e problemas. Mamãe você é e sempre será meu amor.

Ao meu Irmão e ídolo, Felipe Santos Oliveira Adjuto Lima, agradeço a Deus por ter amadurecido nossa relação, para que assim eu pudesse ver como você é importante e especial para mim. Obrigado “moleque doido”, por cada ida a shows, festas e diversões, valeu mesmo. Um agradecimento especial a você pelo maior presente que você poderia ter me dado que são as minhas lindas sobrinhas Isabella e Sophia e o Gustavo.

Aos Meus avós, tanto por parte de mãe como por parte de pai, agradeço pela educação dada aos meus pais.

Agradeço a minha tia Diva, que infelizmente não pode acompanhar fisicamente a nossa vitória, porém eu sei que ela está em um lugar bem melhor a me ajudar, muito obrigado por tudo tia.

Um Agradecimento maior para as minhas cadelas lindas Lunna e Tarcilla, que sempre alegre e feliz me recebe quando retorno ao meu lar.

Agradeço aos meus grandes amigos, Rodrigo, Ricardo, xCleutonx, Alex, Raphael e Takamoto pela longa jornada Hard core e Crossover que nos espera, valeu piãozada.

Agradeço a Deus por ter colocado em minha vida uma garota tão especial e linda. Te amo Rubra.

Meus companheiros de estágios, “x” Turma, que têm uma grande parcela, neste momento em que vivo. Em especial Rodrigo, Bruno, Fernanda, Gabriel e Gustavo.

Ao professor Márcio Botelho pela oportunidade e orientação durante o trabalho realizado. Muito obrigado.

Aos professores Janildo, Luciana e ao LPV-UnB pelas ajudas, conselhos, estruturação pessoal e profissional.

Agradeço aos meus Amigos a “galerinha da UPIS” Fabiana Elias, Helvécio Leal, Guilherme Blume, Ana Maria e Rafaela Magalhães pela ajuda durante a residência e mestrado.

Aos meus amigos Thiago Borinelli, Hygor Loriato, Robson e galerinha do Hospital.

Ao laboratório de patologia clínica/ molecular pela ajuda experimental, conversas, risos e as balinhas de canela.

Gostaria de agradecer eternamente a Tati, vulgo fêssora/”co-orientadora”, muito obrigado pela ajuda minha querida.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

É impossível agradecer a todos. A vocês que fizeram ou fazem parte da minha vida, obrigada! Porquê de alguma maneira me ajudaram a ser quem eu sou.

Obrigado a Todos.

Revisão Bibliográfica

Atualmente o agronegócio é uma das atividades de maior importância no mundo, isto se deve ao fato de diversos países terem esta cultura como um “pilar” da sua economia (Stefanelo 2008). De acordo com o censo do IBGE de 2006, existem 5,2 milhões de estabelecimentos agropecuários distribuídos em 354,87 milhões de hectares do território brasileiro, estando 70% dessas áreas ocupada pela lavoura e pecuária. Estima-se que o valor efetivo de animais de produção no Brasil seja em torno de 205,292 milhões bovinos, 9,164 milhões caprinos, 16,812 milhões ovinos, 5,496 milhões equinos, 38,045 milhões suínos e 1,234 bilhões de galináceos (IBGE 2009).

O aumento na demanda e, conseqüentemente, na produtividade da bovinocultura (Buainain & Batalha 2007), ovinocultura (McManus et al. 2010), suinocultura (Pinheiro et al. 2009) e avicultura (Cenci & Talamini 2006) no centro-oeste, levaram ao fortalecimento agropecuário desta região, tornando-a um dos importantes pólo produtivo nacional.

A cadeia produtiva sofre influência direta do manejo e do ambiente, sendo necessário o controle destes fatores para prevenir prejuízos econômicos significativos (Neves et al. 2010). Sabe-se que em propriedades onde há um manejo de criação consorciada entre animais de espécies distintas, como bovino/ovino (Macêdo et al. 2007; Mendonça et al. 2008) e bovino/suíno (Groff et al. 2005), ocorre a propagação de alguns vírus entre estes animais, pondo em risco a sanidade do rebanho (Barros et al. 2006).

O manejo sanitário está entre as principais atividades profiláticas a ser tomada em uma propriedade, pois o mesmo atuará controlando a disseminação de possíveis agentes infecciosos pré-existentes no lote e prevenindo a entrada de outros patógenos, diminuindo assim as perdas econômicas (Oliveira 2006). A importância desta atividade torna-se ainda mais clara nos casos de animais com alterações neurológicas com quadro clínico semelhante a raiva, devido a sua relevância para saúde pública (Reis et al. 2003).

As doenças neurológicas apresentam alterações frequentemente complexas, necessitando de um bom conhecimento anatomofuncional do sistema nervoso central para chegar ao diagnóstico

presuntivo, uma vez que alterações de origem distintas podem eventualmente apresentar sinais clínicos semelhantes (Riet-Correa et al. 2002, Galiza et al. 2010, Rissi et al. 2010). Devido a importância produtiva e sanitária destas alterações, estudos são constantemente realizados com intuito de obter mais informações sobre as enfermidades (Batista et al. 2010, Galiza et al. 2010, Furlan et al. 2012). As encefalopatias podem ser decorrentes de má formação (Peixoto et al. 2011), traumas, intoxicações (Galiza et al. 2010), distúrbios metabólicos, carenciais (Rissi et al. 2008, Sant'Ana et al. 2009), príon (Barros et al. 2006) e agentes infecciosos (Rissi et al. 2006, Lucena et al. 2010, Riet-Correa et al. 2007) sendo esses últimos mais frequentes (Galiza et al. 2010). Estas causas podem estar presentes de forma individual (Furlan et al. 2012) ou em conjunto com outros agentes (Costa et al. 2011), podendo haver sinergismo entre as causas (Riet-Correa et al. 2007) justificando assim a investigação de diferentes agentes em um mesmo material. A raiva é a principal enfermidade infecciosa responsável em causar meningoencefalite não supurativa em bovinos no Brasil, seguido pelas meningoencefalite herpéticas (Galiza et al. 2010).

Os herpesvírus são vírus compostos por ácido desoxirribonucleico (DNA), fita dupla linear, envelopado pertencentes a família *Herpesviridae* que é dividida em três subfamílias, sendo a *Alphaherpesvirinae* e a *Gammaherpesvirinae* de importância veterinária. Os membros da primeira subfamília são neurotrópicos e possuem ciclo de replicação rápido, já a segunda são predominantemente linfotrópicos e eventualmente epiteliotrópicos (Franco & Roehle, 2007). Os principais Herpesvirus isolados em sistema nervoso central de bovinos com alterações neurológicas no Brasil são: *Herpesvirus* bovino tipo 1 e 5 (BoHV-1 e 5) (Claus et al. 2002, Batista et al. 2010), *Herpesvirus* ovino tipo 2 (OvHV-2) (Furlan et al. 2012), eventualmente *Herpesvirus* suíno tipo 1 (SHV-1) (Barros et al. 2006) e o *Herpesvirus* bovino tipo 4 (BoHV-4) (Costa et al. 2011).

O *Herpesvirus* ovino tipo 2 (OvHV-2) juntamente com *Alcelaphine herpesvirus-2* (AIHV-2) (Klieforth et al. 2002), *Hippotragine herpesvirus-1* (HiHV-1), *Alcelaphine Herpesvirus 1* (AlHV-1), o vírus da FCM clássica em veado-de-cauda-branca (*MCFV-WTD*) (Kleiboeker et al. 2002) e o *Herpesvirus caprino 2* (CpHV) (Dettwiler et al. 2011) pertence ao grupo da FCM. Li et al. (2003)

descreveram três novos membros ainda não caracterizados, além dos mencionados anteriormente, acometendo *Ovibos moschatus* mantido em cativeiro no Canadá, *Capra nubiana* no zoológico da Califórnia e New England, *Oryx dammah* no zoológico de Michigan, *Oryx gazella* no parque de vida selvagem em Ohio e no Novo México. A sequência viral encontrada no *Ovibos moschatus* possui 81,5% de semelhança com o MCFV-WTD, o sequencial amplificado na *Capra nubiana* corresponde a 89,3% do sequencial do CpHV-2 e o encontrado no *Oryx gazella* corresponde 85,1% do sequencial do AIHV-1. Apesar da grande variedade viral pertencente ao grupo da FCM, somente *AIHV-1*, *OvHV-2*, *MCFV-WTD* e o *CpHV-2* foram vinculados a doença clínica (Franco & Roehle, 2007) estando os casos Brasileiros associados ao *OvHV-2* (Furlan et al. 2012).

Detecção de Herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2) por *Nested* reação em cadeia da polimerase (nPCR) em ovinos do Distrito Federal e Entorno.

Rômulo S. A. Eloi¹, Tatiana G. Marçola¹, Guilherme R. Blume¹, Rebekah Rank¹ e Márcio B. Castro^{1*}.

Abstract.- Eloi R.S.A., Marçola T.G., Blume G.R., Riet-Correa F. & Castro M.B. 2012. [**Detection Herpevirus sheep type 2 (OvHV-2) by *Nested* Polymerase Chain Reaction (nPCR) in sheep in the Federal District and surrounding areas.**] Detecção de Herpevirus ovino tipo 2 (OvHV-2) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em ovinos no Distrito Federal e Entorno. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00. Laboratório de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, Universidade de Brasília, Via L4 Norte, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70910-970, Brazil. E-mail: mbcastro@unb.br

Abstract: Malignant catarrhal fever (MCF) is a disease caused by ovine *herpesvirus* type 2 (OvHV-2), responsible for economic losses in different Brazilian regions, in livestock consortium of sheep with cattle. This paper describes the molecular detection of OvHV-2 in nasal swabs and blood cell fraction (FCS) of sheep from 9 properties on the Federal District and surrounding areas. Among the 208 analyzed nasal swab samples, 98 were positive (47.11%). There were no observed differences at the infection rate between pregnant and parous females. Newly born sheep had presented a higher OvHV-2 infection rate than animals older than 60 days. Comparison between nasal swab samples and CSF randomly selected from the same animals demonstrated that nPCR FCS were only able to detect 48.48% of the 66 samples positive nasal swab. From the 66 negative nasal swab samples from the sheep, all of them were also negative in the FCS. The epidemiological data from this study can be used as assistance to elucidate characteristics of the disease and the basis for further studies in DF and surrounding areas.

INDEX TERMS: Herpesvirus, Malignant Catarrhal Fever, PCR, sheep, swab, blood.

¹ Laboratório de Patologia Veterinária - Hospital Veterinário, Universidade de Brasília (UnB), Via L4 Norte, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70910-970, Brasil. *Autor para correspondência: mbcastro@unb.br

RESUMO. A febre catarral maligna (FCM) é uma doença causada pelo Herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2), responsável por perdas econômicas em diferentes regiões brasileiras e caracterizada pela criação consorciada de ovino com bovino. Neste trabalho descreve-se a detecção molecular do OvHV-2 no swab nasal e na fração celular sanguínea (FCS) de ovinos provenientes de 9 propriedades do Distrito Federal e Entorno. Das 208 amostras de swab nasal analisadas, 98 animais foram positivos (47,11 %). Não foram observadas diferenças na taxa de infecção entre fêmeas prenhes e paridas. Ovelhas recém-paridas apresentaram maior taxa de infecção pelo OvHV-2 que animais paridos há mais de 60 dias. Comparando as amostras de swab nasal positiva na *n*PCR e sua respectiva FCS, obteve-se positividade em apenas 48,48% das FCS analisadas. Das amostras negativas testadas no swab nasal dos ovinos, todas também foram negativas nas amostras de FCS. As informações epidemiológicas do presente estudo podem servir de subsídio para elucidar características da enfermidade e de base para novos estudos na região do DF e Entorno.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvirus, Febre Catarral Maligna, PCR ovinos, swab, sangue.

INTRODUÇÃO

A febre catarral maligna (FCM) é uma doença viral ocasionada por um *Herpesvirus* pertencente à subfamília *Gammaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus* (Franco & Roehe 2007). No Brasil os casos de FCM em bovino estão vinculados a infecção pelo Herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2), sendo essa forma denominada “ovino associada” (Mendonça et al. 2008). Esta enfermidade possui alta letalidade (83-100%), período de incubação (PI) longo (3 a 10 semanas) e curso clínico agudo (3-7 dias). O primeiro caso de FCM foi diagnosticado no Brasil em 1924 (Torres 1924), desde então diversos casos ocorreram predominantemente de forma esporádica, sendo descritos em diferentes regiões brasileiras como: nordeste (Galiza et al. 2010, Headley et al 2012), sul (Lucena et al. 2010), sudeste (Lemos et al. 2005) e centro-oeste brasileiras (Mendonça et al. 2008, Furlan et al. 2012).

Apesar da epidemiologia da FCM não estar completamente clara (Russell et al. 2009), os casos são frequentemente vinculados a propriedades onde há criação consorciada entre ovinos portadores assintomáticos do OvHV-2 e bovinos (Frölich et al. 1998). Entretanto há casos de FCM também diagnosticados em propriedades onde a criação era exclusivamente de bovinos (Furlan et al. 2012).

Alterações de manejo e estresse são considerados fatores cruciais para que o vírus saia da latência, passando a ser eliminado pelo ovino, propiciando a transmissão entre as espécies. Eventos reprodutivos como gestação e parição são constantemente apontados como causa primária de estresse em ovelhas, propiciando condições para eliminação viral para o ambiente, e o surgimento de casos em bovinos da FCM ovino-associada (Garmatz et al. 2004). Nos bovinos, o vírus altera a atividade linfocitária supressora, desencadeando a proliferação linfoide e atividade descontrolada das células natural killer, desencadeando as lesões teciduais (Barros et al. 2006, Franco & Roehe 2007).

Os ruminantes com febre catarral maligna apresentam como principais alterações clínico-patológicas, febre de 41-41,5 graus Celsius (°C), ceratite, opacidade de córnea, cegueira, ulcerações na mucosa oral, anorexia, emagrecimento, letargia, andar em círculo, incoordenação motora e

outras alterações neurológicas (Rech et al. 2005, Mendonça et al. 2008, Bastawecy & El-Samee 2012). As principais alterações patológicas consistem em lesões ulcerativas no trato digestivo e respiratório, opacidade de córnea, lesões puntiformes esbranquiçadas nos rins (Garmatz et al. 2004), encefalite com inflamação mononuclear perivascular, arterite e necrose fibrinóide na *rete mirabile* e em várias artérias, e necrose epitelial nas mucosas (Jacobsen et al. 2007, Furlan et al. 2012).

O diagnóstico de FCM, além do exame anatomopatológico, é feito por meio do isolamento viral em cultivo celular (Bastawecy & El-Samee 2012), testes sorológicos como Ci-ELISA (inibição competitiva imunoenzimática) (Frölich et al. 1998, Li et al. 2001), imunofluorescência indireta e exames moleculares como a PCR (Li et al. 1995, Frölich et al. 1998, Loken et al., 2009).

O estudo comparativo entre diferentes testes diagnósticos (histopatologia, PCR e CI-Elisa) para FCM demonstraram que a PCR foi mais eficiente, seguido pela histopatologia e posteriormente CI-Elisa. O mesmo estudo sugere que o teste molecular é capaz de detectar animais portadores do vírus em estágio persistentemente infectado (Frölich et al. 1998). Para análise molecular o material pode ser extraído de tecido embocado (Furlan et al. 2012), resfriado de células de cultivo (Bastawecy & El-Samee 2012), fragmentos de baço, linfonodo (Kleiboeker et al. 2002) sangue periférico (Loken et al. 2009), secreção nasal (Taus et al. 2006), reprodutivas, oral, ocular e fecal (Hüssy et al. 2002). A nested-PCR (nPCR) é uma das técnicas moleculares mais utilizadas no diagnóstico da infecção pelo OvHV-2 (Furlan et al. 2012). Os objetivos deste trabalho foram Determinar a taxa de infecção de ovinos por *Herpesvírus ovino Tipo 2* (OvHV-2) no DF e Entorno. Comparar a eficácia das amostras de swab nasal e fração celular sanguínea para detectar ovinos infectados pelo OvHV-2. Determinar a influência de diferentes estágios reprodutivos de fêmeas ovinas na taxa de infecção pelo OvHV-2.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas aleatoriamente nove propriedades de pequeno a médio porte, localizadas no Distrito Federal e Entorno. Os proprietários foram submetidos previamente a um questionário, com as seguintes informações: 1) Número total de animais do rebanho; 2) Tipo de alimentação/Manejo na propriedade; 3) Estágios reprodutivos das fêmeas. 4) Idade média do plantel; 5) Contato com Bovinos. 6) Histórico de bovinos com sinais neurológicos; 7) Atividade estressante determinada; 8) Presença de abrigo para os animais para proteção das variações climáticas diárias;

Foram colhidos 208 amostras de swab nasal e sangue total de ovinos, sendo 188 fêmeas provenientes de oito propriedades e 20 machos provenientes de uma única propriedade. Os animais selecionados possuíam faixa etária acima de 18 meses de idade, sem alterações clínicas aparentes, sendo as fêmeas separadas em quatro grupos: 1) Fêmeas com 30-60 dias de gestação (FG1); 2) Fêmeas com 61-140 dias de gestação (FG2); 3) Fêmeas com 0-60 dias de paridas (FP1); 4) Fêmeas com 61-120 dias de paridas (FP2). Os ovinos machos (reprodutores) incluídos haviam sido recentemente transportados durante doze horas entre propriedades da região, estando todos em jejum e não havendo histórico prévio de contato com bovino.

Após a contenção física individual dos animais, foi realizada coleta de células de descamação nasal utilizando swab de haste flexível estéril (J.Prolab®), onde após a colheita, a amostra foi acondicionadas em microtubos de 1,5-2 mililitros (ml), contendo 500 microlitros (µl) de tampão fosfato salino (PBS) de pH 7,0. Na sequência, foi realizada venopunção de 3 ml de sangue da veia jugular em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras de sangue foram centrifugadas, separada a fração celular sanguínea, e juntamente como o material de swab nasal, armazenadas congeladas a -20°C até análise. Após a colheita das diferentes amostras, as atividades foram divididas em duas etapas.

A primeira etapa consistiu na avaliação molecular dos 208 swab nasais, sendo utilizado o kit comercial QiAamp® DNAmuni kit (QIAGEN) para extração do DNA das amostras analisadas

segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após os resultados obtidos das amostras de swab nasal, com intuito de avaliar o melhor tipo de amostra (swab/ sangue) para detecção de OvHV-2, foram selecionadas aleatoriamente 66 amostras de fração celular sanguínea de animais sabidamente positivos no Swab nasal e 66 amostras de fração celular sanguínea de casos negativos no Swab nasal, sendo utilizado para extração o Kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para confirmação da extração e presença de DNA amplificável, foi realizado PCR específico para Gliceraldeído-3-fosfato humano (GAPDH) de todas as amostras.

A técnica de nested-PCR (nPCR) foi realizada com os pares de iniciadores (primers) 556 (AGTCTGGG-TATATGAATCCAGATGGCTCTC) e 755 (AAGATAAGCA-CCAGTTATGCATCTGATAAA) para primeira reação. Para a segunda reação utilizou-se 1µL do produto da PCR primária, com iniciadores 556 e 555 (5'-TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3') (Mendonça et al., 2008). A amostra utilizada no controle positivo é proveniente de tecido emblocado em parafina de um bovino previamente diagnosticado com febre catarral maligna pela avaliação histopatológica. Para controle negativo foi utilizada água deionizada e purificada pelo sistema mili-Q. A reação foi realizada no termociclador C1000 Thermal Cycler® (Bio Rad). As condições de amplificação para a primeira reação foram: 94 °C por 7 minutos de desnaturação, 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 63 °C por 1 minuto (anelamento), 72 °C por 1 minuto (extensão). A segunda reação se diferenciou da primeira pela temperatura de anelamento de 67 °C. Produtos da segunda PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta resultando em um produto de 238 pares de base (pb) nos animais positivos. Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular Animal (MPMA) da UnB. Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo teste Exato de Fisher e Chi-quadrado, intervalo de confiança = 95%, valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

As amostras foram coletadas em agosto de 2012, período que apresentou baixa umidade relativa do ar (20%), reduzido índice pluviométrico e temperatura média elevada (35°C) no DF e Entorno. O regime de criação instituído nas propriedades avaliadas era extensivo, pastagens formadas predominantemente por *Brachiaria sp.* e a água fornecida a vontade. Somente 3 das 9 (33,33%) propriedades visitadas contavam com abrigo para proteção dos animais das alterações climáticas diárias. Nas demais propriedades, o rebanho permanecia diretamente expostos às variações ambientais. Os resultados obtidos correlacionados com as propriedades com abrigo (PCA) ou sem abrigo (PSA) de proteção animal estão descritos no quadro 1. Não houve diferença nas taxas de infecção (TI) pelo OHV-2 entre os ovinos amostrados ($p \geq 0,05$) nas PCA e PSA.

Os ovinos da propriedade P1 apresentaram TI pelo OHV-2 superior ao observado nas fazendas P7 e P8 ($p \leq 0,05$). O número de animais positivos na propriedade P4 foi substancialmente maior que nas propriedades P1, P3, P5, P6, P7 e P8 ($p \leq 0,05$). Os ovinos da propriedade P5 apresentaram TI superior a obtida na propriedade P7 ($p \leq 0,05$). As demais comparações entre os resultados das propriedades não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$).

A criação consorciada entre ovinos e bovinos foi observada em 5 propriedades. Em três dessas, não havia contato direto entre as espécies, uma vez que os animais compartilhavam o piquete em temporadas distintas. Somente em duas propriedades a criação das espécies era conjunta, permitindo contato direto entre os animais. Não foram relatadas alterações neurológicas nos bovinos contactantes. Em todas as propriedades avaliadas houve ao menos um ovino positivo na análise molecular da amostra de swab nasal. As demais informações colhidas nas propriedades estão representadas no quadro 2.

Das 208 amostras de swab nasal avaliadas, 47,11% ($n=98$) dos casos foram positivas na análise da *n*PCR, estando representados no gel de Agarose 2% por uma única banda (238pb). Dos

20 ovinos machos analisados 50% (n=10) foram positivos, já das 188 ovelhas amostradas o índice de positividade correspondeu a 46,80% (n=88). A frequência de casos positivos entre ovelhas gestantes (47,82%) e paridas (44,53%) foram semelhantes ($p \geq 0,05$).

Entre os grupos de ovelhas avaliados que apresentaram positividade na *n*PCR de swab nasal, FG1 (58,33 %), FP1 (56,71 %), FG2 (45,61 %) e FP2 (28,84 %) (Quadro 2), somente FP1 e FP2 apresentaram diferenças entre si ($p \leq 0,05$).

A análise comparativa entre os resultados de casos positivos em swab nasal (Figura 1 A) e a sua fração celular sanguínea (Figura 1 B) demonstrou que apenas 48,48% (n=32) das 66 amostras sanguíneas foram positivas ($p \leq 0,05$). Todas as 66 ovelhas negativas no *n*-PCR de swab nasal também apresentaram resultado idêntico na avaliação da fração celular sanguínea.

DISCUSSÃO

A FCM é uma enfermidade que apresenta fatores epidemiológicos ainda pouco conhecidos, que dificultam seu diagnóstico e a compreensão no surgimento de surtos nos bovinos e outros animais (Bremer 2010).

A prevalência de ovinos portadores do OHV-2 apresenta grande variação de acordo com a região estudada e o tipo de teste utilizado. Testes moleculares detectaram índices de infecção pelo vírus em ovinos bastante variável em outras partes do mundo como 77% na África do Sul (Bremer 2010), 70,5 % em Portugal (Cortez et al. 2008), 84,8% na Índia (Wani et al. 2006) e 99 % nos Estados Unidos (Li et al. 1995). O levantamento da infecção pelo OHV-2 em ovinos do DF e Entorno, mesmo não representando a totalidade da população da região, apresenta resultado inferior ao descritos em outras regiões do mundo.

Ao comparar individualmente as propriedades, foram observadas diferenças ($p \leq 0,05$) principalmente entre as fazendas com as taxas de infecção mais elevadas, daquelas com os menores valores. É provável que variações no manejo instituído no rebanho possam ter influenciado nos resultados, de forma semelhante ao encontrado na África do Sul. (Bremer 2010). Entretanto, as

informações e valores determinados nos rebanhos do DF e Entorno, não foram suficientes para apontar os fatores envolvidos nessas diferenças.

No presente estudo não foram observadas diferenças na taxa de infecção entre fêmeas gestantes e paridas. Entretanto, comparando os subgrupos, ovelhas recém-paridas (FP1) apresentaram taxa de infecção maior que o grupo de ovelhas paridas há mais de 60 dias (FP2). Esse resultado sugere que fêmeas recém-paridas poderiam apresentar maior eliminação de partícula viral para o ambiente, aumentando o risco de transmissão da FCM.

Ovelhas paridas foram consideradas capazes de apresentar maior quantidade de partículas virais em amostras de swab nasal (Li et al. 2001^a). Posteriormente foi demonstrado não haver relevância estatística entre a eliminação viral na secreção nasal de fêmeas paridas e não-paridas na transmissão da FCM (Li et al. 2004). Entretanto, o estresse gestacional em ovelhas é considerado fator que propicia a ativação viral, sendo importante na sua propagação (Baxter et al. 1997).

Ovinos machos infectados do DF e Entorno podem apresentar importância na manutenção do OHV-2 nos rebanhos e transmissão viral para os demais animais (Hüssy et al. 2002, Li et al. 2004, Yeruham et al. 2004). Entretanto, fêmeas ovinas são vinculadas mais frequentemente à transmissão da doença, devido ao estresse reprodutivo que estão sujeitas (Garmatz et al. 2004, Syrjälä et al. 2006, Furlan et al. 2012), apesar de ovinos machos também apresentarem a infecção pelo OHV-2 (Hüssy et al. 2002, Li et al. 2004).

Em cinco propriedades visitadas, onde havia criação conjunta (direta ou indireta) de ovinos com bovinos, não foram relatados casos de FCM ou outras enfermidades com sinais neurológicos nos rebanhos. Esses achados demonstram que a predisposição ambiental e de manejo atribuídos frequentemente a casos de febre catarral maligna (Abu Elzein et al. 2003, Rech et al. 2005, Bastawecy I.M. & El-Samee 2012) nem sempre são suficientes para explicar o surgimento ou não da doença. Uma possível explicação para o não surgimento da FCM nas propriedades poderia estar associada à eliminação de níveis infectantes insuficientes pelos ovinos, para causar a doença nos bovinos (Taus et al, 2006). Variações ou condições ambientais também podem não favorecer a

eliminação de partículas virais pelos ovinos (Bremer 2010). A possibilidade dos bovinos tornarem-se portadores assintomáticos também pode interferir no surgimento de casos da FCM (Powers et al. 2005).

O estresse é considerado fator crucial para que ocorra a eliminação de partícula viral pelos ovinos, porém pouco se sabe sobre a relação dos seus diversos fatores causais, além da parição, com o surgimento da febre catarral maligna (Furlan et al. 2012). Apesar das variações climáticas não serem listadas como um possível fator estressante, baseando-se nos limites de tolerância térmica para ovinos (Oliveira 2011), pode-se considerar que os animais estudados foram submetidos a estresse térmico devido às condições climáticas no período do experimento.

Um fator importante a ser considerado, e que poderia influenciar os resultados observados em aproximadamente 50% dos animais estudados (n=101), foi a existência ou ausência de estrutura de proteção para as variações climáticas diárias nas propriedades. Entretanto, após a comparação da TI entre as propriedades, não foram encontradas diferenças ($p \geq 0,05$) que comprovem que o fator térmico possa ter influenciado nos índices de infectividade, demonstrando que nas condições desse estudo não foram relevantes. Estudos futuros relacionando variações térmicas, estresse clínico e taxa de infecção são necessários para determinar a importância desta hipótese na taxa de infecção no rebanho.

Diferentes testes podem ser utilizados para detecção de ovinos portadores do OvHV-2 (Li et al., 1994; Li et al., 2001), porém o teste nPCR é amplamente utilizado por possuir alta sensibilidade e especificidade, propiciando um resultado mais fidedigno (Baxter et al. 1993, Frölich et al. 1998, Li et al. 2001, Li et al., 2001^a, Kim et al. 2003).

Durante a leitura no transiluminador a formação de uma ou duas bandas (340-420 pb) além da 238 pb pode ocorrer, porém nas amostras analisadas houve predominantemente a formação de uma única banda (238 pb). O não surgimento das demais bandas pode estar relacionado ao fato das amostras analisadas terem sido previamente diluídas, diminuindo assim a grande quantidade de DNA viral nas amostras, impedindo a ligação do iniciador 555 em outros sítios (Li et al 1995).

As amostras sanguíneas são utilizadas com maior frequência na detecção molecular de ovinos infectados pelo OvHV-2 (Baxter et al. 1993, Li et al. 1995, Wani et al. 2006, Loken et al. 2009, Bremer 2010, Dabak et al. 2012). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram uma maior eficiência na detecção molecular nas amostras de swab nasal quando comparada com a fração sanguínea, o que havia previamente sido descrito em outros estudos (Li et al. 2001, Li et al. 2004).

Mesmo não estando completamente elucidada a patogenia da infecção pelo OvHV-2, acredita-se que o vírus esteja presente no sangue dos animais apenas durante a fase aguda da infecção (Gailbreath et al., 2008, Li et al. 2011, Li et al. 2012). O fato dos ovinos infectados permanecerem sem sinais clínicos impossibilita a determinação do tempo real de evolução da enfermidade nesta espécie. É possível assim especular que os ovinos amostrados com resultado negativo no sangue neste estudo, possivelmente estavam infectados cronicamente. De qualquer forma, a detecção de um número maior de ovinos infectados em amostras de secreção nasal sugere a importância das vias aéreas na transmissão da Febre Catarral Maligna ovino-associada (FCM-AO). Isso justifica o emprego dessas amostras em estudos relacionados à forma de transmissão do OvHV-2 (Kim et al., 2003, Taus et al., 2005, Taus et al., 2006; Gailbreath et al., 2008).

A febre catarral maligna (FCM), enfermidade com alta taxa de letalidade entre os bovinos, é transmitida no Brasil principalmente por alimentos contaminados por materiais biológicos (restos placentários e outros) de ovinos infectados pelo OvHV-2. Apesar de haverem poucos casos suspeitos da FCM no Distrito Federal e Entorno, com o aumento do rebanho ovino na região, pode haver o incremento da exposição dos bovinos, e assim, o surgimento de casos da doença. São poucas as informações no País à respeito da taxa de infecção pelo OvHV-2 em ovinos, uma vez que na espécie, a quase totalidade dos animais são apenas portadores assintomáticos.

O desenvolvimento e padronização do diagnóstico molecular para a FCM possui aspecto relevante para o serviço de fiscalização sanitária animal nacional. Os sinais clínicos podem se

confundir com outras enfermidades que afetam o SNC como a raiva, e a lesão ulcerativa oral, mimetizar alterações presentes em doenças de notificação obrigatória como a Febre Aftosa.

O presente estudo nos ovinos do DF e Entorno demonstrou a elevada taxa de infecção pelo OvHV-2 nos rebanhos da região. Outro achado importante demonstrou que ovelhas recém-paridas apresentam níveis de infecção maior do que ovelhas paridas há mais de 60 dias. Amostras de swab nasal são mais eficazes para a detecção da infecção viral quando compara com a fração sanguínea, além de ser um método menos invasivo de colheita.

Os resultados obtidos são pioneiros na região, fornecendo informações epidemiológicas, sobre alguns fatores predisponentes e amostrais importantes, servindo de base para futuros estudos da FCM e sua patogenia.

Agradecimentos. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro. Projeto financiado pelo Proc. CNPq 573534/2008-0 e Bolsa Produtividade - Proc. CNPq 308700/2009-0.

REFERÊNCIAS

- Abu Elzein E.M.E., Housawi F.M.T., Gameel A.A., Al-Afaleq A.I. & El-Bashir A.M. 2003. Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever Involving 3–5-Week-Old Calves in Saudi Arabia The Journal of Veterinary Medicine Science. n. 50, p. 53–59.
- Barros C.S.L.; Driemeier D.; Dutra I.; Lemos R.A.A. 2006. Meningoencefalite por Herpesvirus Bovino Tipo 5 (BHV-5). COLEÇÃO VALLÉE-Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. Ed. 1ª, São Paulo, AGNS Gráfica & Editora.
- Bastawecy I.M. & El-Samee A.A.A. 2012. First Isolation and Identification of Ovine Herpesvirus 2 Causing Malignant Catarrhal Fever Outbreak in Egypt. Life Science Journal. v.9, n.3.
- Batista H.B.C.R., Schmidt E., Spilki F.R., Franco A.C. & Roehe P.M. 2010 Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.62 , n.5, p.1023-1028.
- Baxter S.I.F., Wiyono A., Pow I. & Reid H.W. 1997. Identification of ovine herpesvirus-2 infection in sheep. Archives Virology. v. 142, p. 823±831.
- Baxter S.I.F., Pow I., Bridgen A. & Reid H.W. 1993. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. Archive of Virology. n. 132, p. 145-159.
- Buainain A.M. & Batalha M.O. 2007. Cadeia Produtiva da Carne Bovina. In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Brasília, v.8, 86p.
- Bremer C.W. 2010. The prevalence of ovine herpesvirus-2 in 4 sheep breeds from diferente regions in South Africa. Journal of the South African Veterinary Medical Association. v. 81, n. 2, p. 93–96.
- Cenci V. & Talamini E. 2006. Perspectivas e Prospectivas da Avicultura nas Regiões Sul e Centro-Oeste: uma análise baseada nas vantagens comparativas. In: XLIV Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Fortaleza, Brasil.

- Claus M.P.; Alfieri A.F.; Alfieri A.A. Herpesvírus Bovino Tipo 5 e Meningoencefalite Herpética Bovina. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.23, n.1, p.131-141, 2002.
- Costa E.A., Vasconcelos A.C., Bomfim M.R.Q., Amorim H.B., Lima G.B.L., Coelho F.M. & M. Resende. 2011. Neurological disorder in cattle associated with bovine herpesvirus 4. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.63, n.4, p.828-835.
- Cortez P.P., Carvalheira J., Paupério S. & Thompson G. 2008. Prevalence of ovine herpesvirus type 2 in north-west Portugal. *Veterinary Record*. v. 162, p. 282-284.
- Dabak M., Dabak D. O., Karapinar T. & Bulut H. 2012. Vitamin D Status in Cattle with Malignant Catarrhal Fever. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v. 74, n. 1, p. 125–128.
- Dettwiler M., Stahel A., Krüger S., Gerspach C., Braun U., Engels M. & Hilbe M. 2011. A possible case of caprine-associated malignant catarrhal fever in a domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Switzerland. *BMC Veterinary Research*. n.7, v. 78.
- Franco A.C. & Roehe P.M. *HERPESVIRIDAE*. In: Eduardo Furtado Flores. *Virologia Veterinária*. UFSM-RS, 2007. 888p.
- Frölich K., Li H. & Müller-Doblies U. 1998. Serosurvey for antibodies to Malignant Catarrhal Fever- Associated vírus in free-living and captive cervids in Germany. *Journal of wildlife diseases*. v. 34, n. 4, p. 777-782.
- Furlan F.H., Amorim T.M., Justo R.V., Mendes E.R.S., Zilio M.G., Costa F.L., Nakazato L. & Colodel E.M. 2012. Febre catarral maligna em bovinos no norte de Mato Grosso – Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2012. v. 40, n.2, p. 1043.
- Galiza G.J.N., Silva M.L.C.R., Dantas A.F.M., Simões S.V.D. & Riet-Correa Franklin. 2010. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.30, n.3, p.267-276.
- 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 24, v. 2, p 93-106.

- Gailbreath K. L., Taus N. S., Cunha C. W., Knowles D. P. & Li H. 2008. Experimental infection of rabbits with ovine herpesvirus 2 from sheep nasal secretions. *Veterinary Microbiology*. v132. p. 65–73.
- Groff F.H.S., Merlo M.A., Stoll P.A., Stepan A.L.; Weiblen R., Flores E.F. 2005. Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 25, v. 1, p. 25-30.
- Headley A.S., Sousa I.K.F. Minervino A.H.H., Barros I.O., Junior R.A.B.; Alfieri A.F., Ortolani E.L. & Alfieri A.A. 2012. Molecular confirmation of ovine herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever lesions in cattle from Rio Grande do Norte, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n.32, v.12, p.1213-1218.
- Hüssy D., Janett F., Albini S., Staüber N., Thun R. & Ackermann M. Analysis of the Pathogenetic Basis for Shedding and Transmission of Ovine Gamma Herpesvirus 2. 2002. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 4700–4704.
- IBGE 2006. Disponível online em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>. Acesso em: 21/11/2010.
- IBGE 2009. Disponível online em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1. Acesso em: 22/11/2010.
- Jacobsen B., Thies K., von Altrock A., Förster C., König M. & Baumgärtner. 2007. W. Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. *Veterinary Microbiology*. v.124, p. 353–357.
- Kleiboeker S. B., Miller M. A., Schommer S. K., Ramos-Vara J. A., Boucher M., & Turnquist S.E. 2002. Detection and Multigenic Characterization of a Herpesvirus Associated with Malignant Catarrhal Fever in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) from Missouri. *Journal of Clinical of Microbiology*. v. 40, n. 4, p. 1311–1318.

- Kim O., Li H. & Crawford T.B. 2003. Demonstration of sheep-associated malignant catarrhal fever virions in sheep nasal secretions. *Virus Research*, v. 98, p. 117–122.
- Klieforth R., Maalouf G., Stalis I., Terio K., Janssen D. & Schrenzel Mark. 2002. Malignant Catarrhal Fever-Like Disease in Barbary Red Deer (*Cervus elaphus barbarus*) Naturally Infected with a Virus Resembling Alcelaphine Herpesvirus 2. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. p. 3381–3390.
- Lemos R.A.A., Rech R.R., Guimarães E.B., Kadri A. & Dutra I.S. 2005. Febre catarrhal maligna em bovinos do Mato Grosso do Sul e de São Paulo. *Ciência Rural*. v.35, n.4, p.932-934.
- Li H., Shen D.T., Knowles D.P., Gorham J.R. & Crawford T.B. 1994. Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 32, n.7, p.1674.
- Li H., Shen D.T., Toole D.O., Knowles D.P., Gorham J.R., & Crawford T.B. 1995. Investigation of Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever Virus Infection in Ruminants by PCR and Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of clinical microbiology*. v. 33, n. 8, p. 2048–2053.
- Li H., Shen D. T., Jessup D. A., Knowles D. P., Gorham J. R., Thorne T., O’Toole D. & Crawford T.B. 1996. Prevalence of antibody to malignant catarrhal Fever Virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition Elisa. *Journal of wildlife disease*. v. 32,n .3 p437-443.
- Li H., McGuire T.C., Müller-Doblies U.U. & Crawford T.B. 2001. A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.13, p. 361–364.
- Li H., Hua Y., Snowden G. & Crawford T.B. 2001a. Levels of ovine herpesvirus 2 DNA in nasal secretions and blood of sheep: implications for transmission. *Veterinary Microbiology* v. 79, p. 301-310.

- Li H., Wunschmann A., Keller J., Hall D. G. & Crawford T.B. 2003. Caprine herpesvirus-2-associated malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) J Vet Diagn Invest. v. 15, p.46–49.
- Li H., Taus N.S., Lewis G.S., Kim O., Traul D.L. & Crawford T.B. 2004. Shedding of Ovine Herpesvirus 2 in Sheep Nasal Secretions: the Predominant Mode for Transmission. Journal of Clinical Microbiology. v. 42, n. 12, p. 5558–5564.
- Li H., Cunha C.W., Gailbreath K.L., O’Toole D., White S.N., Vanderplasschen A., Dewals B., Knowles D.P. & Taus N.S. 2011. Characterization of ovine herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever in rabbits. Veterinary Microbiology. v. 150, p. 270–277.
- Li H., Brooking A., Cunha C.W., Highland M.A., O’Toole D., Knowles D.P, Taus N.S. 2012. Experimental induction of malignant catarrhal fever in pigs with ovine herpesvirus 2 by intranasal nebulization. Veterinary Microbiology.
- Loken T., Bosman A.M., Vuuren M.V. 2009. Infection with Ovine herpesvirus 2 in Norwegian herds with a history of previous outbreaks of malignant catarrhal fever. J Vet Diagn Invest 21:257–261.
- Lucena R.B., Pierezan F., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Figuera R.A. e Barros C. S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. 2010. Pesquisa Veterinária Brasileira. n.30, v.5, p.428-434.
- Macêdo J.T.S.A., Riet-Correa F., Simões S.V.D., Dantas A.F.M. & Nobre V.M.T. 2007. Febre catarral maligna em bovinos na Paraíba. Pesquisa Veterinária Brasileira. n. 27, v. 7, p. 277-281.
- Mcmanus C., Sasakil L.C.B., Louvandini H., DIAS L.T., Teixeira R.A., Alves J.M. & Lucci C.M. 2010. Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. Ciência Rural. v.40, p. 396-402.

- 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 28, v. 3, p. 155-160.
- Neves J.P., Miranda K.L. & Tortorella R.D. 2010. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 39, p.414-421.
- Oliveira M.C.S. Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. Embrapa pecuária Sudeste. São Carlos, São Paulo. 2006. 34p.
- Oliveira E. M. B. 2011. Tolerância ao calor, medidas morfométricas e cortes comerciais em diferentes grupos genéricos de ovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. 112p.Tese.
- Peixoto P.V., Cunha B.M., França T.N., Junior P.S.B., Brust L.A.C., Terra T.M.F. & Armién A.G. 2011. Encefalopatia hereditária em bovinos no Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 31, v.9, p.723-730.
- Pinheiro M.S.M., Santos L.C., Kirsch H.M., Miguel G.Z. & Angreves G.M. 2009. Levantamento do perfil da suinocultura no município de Pontes E Lacerda – MT. In: 47º Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre, Brasil.
- Powers J. G., VanMetre D. C., Collins J. K., Dinsmore R. P., Carman J., Patterson G., Brahmhatt D. & Callan R. J. 2005. Evaluation of ovine herpesvirus type 2 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *The Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 227, n. 4.
- Rech R.R., Schild A.L., Driemeier D.; Garmatz S.L., Oliveira F.N., Correa F.R., Barros C.S.L. 2005. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 25, v. 2, p. 97-105.
- Reis M.C., Costa J.N., Peixoto A.P.C., Figueiredo L.J.C., Menezes R.V., Ferreira M. M. & Sá J.E. U. Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística da Clínica

- de Bovinos (Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia), Universidade Federal da Bahia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999 (Relato de caso). 2003. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. v.4, n.1, p. 12-17.
- 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. Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 22, n.4, p.161-168.
- Riet-Correa F., Schild A. L., Lemos R.A.A., Borges J.R.J. Doenças de Ruminantes e Equídeos. Ed.3ª. Santa Maria-RS: Fenovi, 2007. v.1.719p.
- Rissi D.R., Oliveira F.N.; Rech R.R.; Pierezan F.; Lemos R.A.A.; Barros C.S.L. 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por Herpesvírus bovino-5. Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 26, n. 2, p.123-132.
- Rissi D.R., Pierezan F., Sá e Silva M., Flores E.F. & Barros C.S.L. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. J Vet Diagn Invest. n. 20, p. 46–349.
- Rissi D.R., Pierezan F., Oliveira-Filho J.C., Lucena R.B., Carmo P.M.S. & Barros C.S.L. 2010. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. n. 30, v. 11, p. 958-967.
- Russell G.C., Stewart J.P. & Haig D.M. 2009. Malignant catarrhal fever: A review. The Veterinary Journal. v.179, p. 324–335.
- Sant’Ana F.J.F., Rissi D.R., Lucena R.B., Lemos R.A.A., Nogueira A.P.A. & Barros C.S.L. 2009. Polioencefalomalacia em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões no encéfalo. Pesquisa Veterinária Brasileira. n.29, v.7, p.:487-497;
- Stefanelo E. O agronegócio mundial e brasileiro. 2008. Disponível online em: <http://www2.fae.edu/galeria/getImage/1/746399500200267.pdf>. Acesso em 23/11/2010.
- Acesso em: 22/11/2010.

- Syrjälä P., Saarinen H., Laine T., Kokkonen T. & Veijalainen P. 2006. Malignant catarrhal fever in pigs and a genetic comparison of porcine and ruminant virus isolates in Finland. *Veterinary Record*. v. 159, p. 406-409.
- Taus N. S., Traul D. L., Oaks J. L., Crawford T. B., Lewis G. S. & Li H. 2005. Experimental infection of sheep with ovine herpesvirus 2 via aerosolization of nasal secretions. *Journal of General Virology*. v. 86. p. 575–579.
- Taus N. S., Oaks J. L., Gailbreath K., Traul D. L., O’Toole D. & Li H. 2006. Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. *Veterinary Microbiology*. v. 116, p. 29–36.
- Taus N. S., Schneider D. A., Oaks J. L., Yan H., Gailbreath K. L., Knowles D. P. & Li Hong. 2010. Sheep (*Ovis aries*) airway epithelial cells support ovine herpesvirus 2 lytic replication in vivo. *Veterinary Microbiology* n.145 p. 47–53.
- Torres S.A. 1924. Oca, mal do chifre ou coriza gangrenosa dos bovinos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*. v.1, n.4, p.144-159.
- Wani S.A., Samanta I., Pandit F., Buchoo B.A., Peer F., Bhat M.A. 2006. Molecular epidemiology of ovine herpesvirus type 2 infection in Kashmir, India. *The Veterinary Record*. V. 159, p. 587-590.
- Yardımcı M., Sahin E.H., Cetingul I.S., Bayram I., Aslan R. & Sengor E. 2012. Stress responses to comparative handling procedures in sheep *The Animal Consortium*. n.7, v.1, p. 143–150.
- Yeruham I., David D., Brenner J., Goshen T. & Perl S. 2004. Malignant catarrhal fever in a Barbary sheep (*Ammotragus lervia*). *The Veterinary Record*. n.155 p. 463-465.

Quadro 1. Taxa de infecção (%) pelo OvHV-2 em ovinos provenientes de propriedades com (PCA) ou sem (PSA).

PCA		PSA	
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
42,05 (n=45)	57,95 (n=62)	52,47 (n=53)	48 (n=47,53)

PCA= Propriedades com abrigo. PSA= Propriedades sem abrigo.

Quadro 2. Informações clínico-epidemiológicas nos plantéis de ovelhas do Distrito Federal e Entorno.

PR	NTO	TOC (%)	TOP (%)	IMR	CB	NB	Manejo	Histórico
1	75	53,33	32,5	24 m	S	18	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais possuíam Abrigo.
2	22	68,18	73,33	29 m	S	22	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais não possuíam Abrigo.
3	55	85,45	46,80	36 m	N	0	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais possuíam Abrigo.
4	12	75	100	34 m	s *	2	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais não possuíam Abrigo.
5	42	76,19	53,12	25 m	N	0	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais não possuíam Abrigo.
6	34	73,53	52	23 m	N	0	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais não possuíam Abrigo.
7	18	66,66	16,66	26 m	s*	3	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais não possuíam Abrigo.
8	13	61,54	12,5	36 m	S	1	Extensivo (pasto nativo <i>Brachiaria</i> sp.).	Fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (gest./pari.). Os Animais não possuíam Abrigo.

PR= Propriedades. NTO= Número total de ovelhas. TOC= Total de ovelhas colhidas. TOP= Total de ovelhas positivas.

IMR= Idade média do rebanho (meses). CB= Contato de ovinos com bovinos. NB= Quantidade de bovinos na

propriedade. n= Não. s= Sim. s*= Sim/dividem o mesmo piquete.

Quadro 3. Taxa de infecção pelo OvHV-2 nos grupos de ovelhas no DF e Entorno.

Grupos	Total	Positivos(%)
FG1	n=12	58,33 (n=7)
FG2	n=57	45,61 (n=26)
FP1	n=67	56,71 (n=38)
FP2	n=52	28,84 (n=15)
	188	

FG1 = Fêmeas com 30 a 60 dias de gestação; FG2 = Fêmeas com 61 a 140 dias de gestação; FP1 = Fêmeas com até 60 dias de paridas; FP2 = Fêmeas com 61 a 120 dias de paridas.

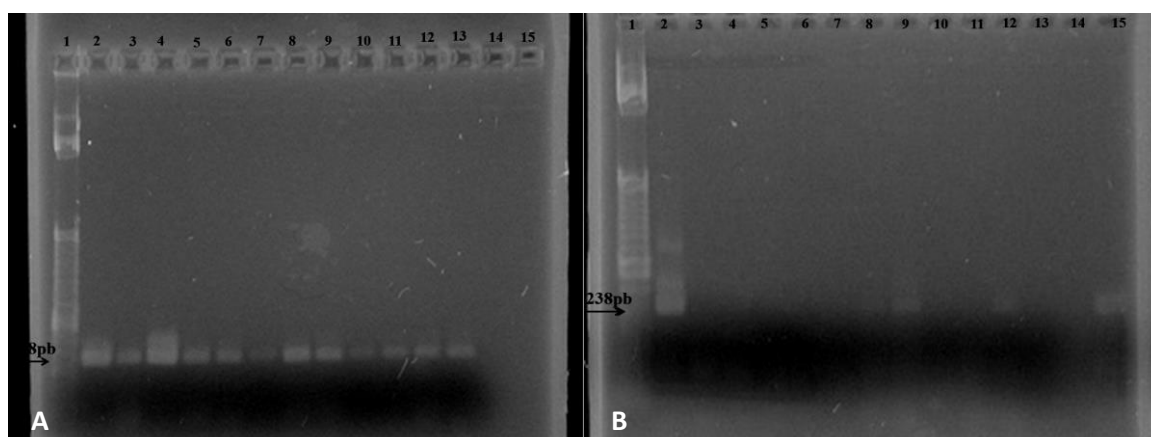


Figura. 1A. Nested- Reação em Cadeia da Polimerase (n-PCR). Eletroforese em Gel de agarose a 2% de swab nasal: 1) Ladder (50 pb); 2) Controle Positivo; 3) Swab 3; 4) Swab 37; 5) Swab 65; 6) Swab 72; 7) Swab 102; 8) Swab 128; 9) Swab 152; 10) Swab 167; 11) Swab 178; 12) Swab 191; 13) Swab 201; 14) Swab 204; 15) Controle negativo (DH2O). **B.** Eletroforese em Gel de agarose a 2% da fração celular sanguínea (FCS): 1) Ladder (50 pb); 2) Controle Positivo; 3) Controle negativo (DH2O); 4) FCS 3; 5) FCS 37; 6) FCS 65; 7) FCS 72; 8) FCS 102; 9) FCS 128; 10) FCS 152; 11) FCS 167; 12) FCS 178; 13) FCS 191; 14) FCS 201; 15) FCS 204;