

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS A SÍNDROMES NEUROLÓGICAS
DE BOVINOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

PORTO ALEGRE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS A SÍNDROMES NEUROLÓGICAS DE
BOVINOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Autora: Mônica Paaz

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, na área de concentração de
Microbiologia – Virologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Franco
Coorientadora: Profa. Dra. Carla R.
Rodenbusch

PORTO ALEGRE

2024

Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

PAAZ, MÔNICA
AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS A SÍNDROMES
NEUROLÓGICAS DE BOVINOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
/ MÔNICA PAAZ. -- 2024.

49 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Coorientadora: Carla Rosane Rodenbusch.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Síndromes neurológicas. 2. Raiva bovina. 3. Alfa herpesvírus tipo - 1 e tipo - 2. 4. Febre Catarral Maligna. 5. Babesíase cerebral. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Rodenbusch, Carla Rosane, coorient. III. Título.

Mônica Paaz

AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS A SÍNDROMES NEUROLÓGICAS
DEBOVINOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Aprovada em 26 de agosto de 2024

APROVADA POR:

Profa. Dra. Ana Cláudia Franco
Orientadora e presidente da comissão

Profa. Prof. Dra. Carla Rosane Rodenbusch
Coorientadora

Profa. Dra. Fabiana Quoos Mayer
Membro da comissão

Profa. Dra. Martha Trindade Oliveira
Membro da comissão

Prof. Dr. Matheus Neumann Weber
Membro da comissão

Àqueles que caminharam ao meu lado nesta jornada, meus professores e colegas, que com sua sabedoria e companheirismo, me inspiraram a alcançar patamares mais altos. Este trabalho é um reflexo do amor que tenho pela vida em todas as suas formas e da honra por poder contribuir para um mundo melhor para todos os seres que nele habitam.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Arno Heinz Paaz e Brigitte Paaz, que já não estão mais comigo, mas cuja memória e ensinamentos continuam a guiar meus passos. Este trabalho é, em parte, um tributo ao amor, à sabedoria e ao apoio incondicional que sempre me ofereceram. A eles, dedico esta realização com toda a minha saudade e carinho.

Expresso meu profundo reconhecimento aos meus professores e colegas, cujas orientações, apoio e colaboração foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço à minha orientadora, Ana Cláudia Franco, e à minha coorientadora, Carla Rodenbusch, por suas valiosas contribuições, paciência e por sempre me incentivarem a alcançar a excelência.

Aos dedicados pesquisadores do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, cuja confiança em meu trabalho e apoio incondicional foram fundamentais para a realização desta tese. Sua colaboração e empenho proporcionaram um ambiente enriquecedor e inspirador, tornando possível a concretização deste projeto.

Ao Laboratório de Virologia da UFRGS, por oferecer um suporte contínuo e uma infraestrutura de excelência que foram essenciais para a realização desta pesquisa. A colaboração e o comprometimento de todos os membros do laboratório foram decisivos para o sucesso deste trabalho e para meu crescimento como pesquisadora.

Agradeço profundamente ao Laboratório Axys, que desempenhou um papel crucial ao despertar em mim uma paixão pela ciência. Sou imensamente grata por ter tido a chance de crescer profissionalmente e expandir meus conhecimentos, rodeada por uma equipe dedicada e competente. Esta jornada não apenas consolidou minha trajetória acadêmica, mas também aprofundou meu amor pela pesquisa e pelo avanço científico.

À minha amiga e médica veterinária, Michelen Gonçalves, por sua amizade, apoio constante e pelas valiosas contribuições ao longo desta jornada.

Gostaria de expressar meu sincero reconhecimento aos meus amigos Bruna Parmigiani, Lissandra Anderson, Neli Terezinha e Jandrei Santos. O apoio, a amizade e o incentivo de cada

um de vocês foram fundamentais ao longo desta jornada. Suas palavras de encorajamento e a presença constante foram uma fonte de força e motivação, e sou profundamente agradecida por ter amigos tão dedicados e solidários ao meu lado.

“A compaixão para com os animais é uma das mais nobres virtudes da natureza humana.”

— Charles Darwin

RESUMO

As enfermidades do sistema nervoso central são comumente relatadas em bovinos e constituem um grupo de doenças fatais que apresentam um conjunto de sinais clínicos, caracterizado por distúrbios neurológicos, e assim, provocando grandes prejuízos econômicos à pecuária no Brasil. Este estudo teve como objetivo investigar os principais agentes virais e parasitários em encéfalos de bovinos enviados para o diagnóstico de raiva para o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor. Foram analisados 118 encéfalos bovinos encaminhados em 2019 para diagnóstico de raiva no IPVDF, abrangendo amostras do córtex, cerebelo, medula e, quando presentes, as meninges. As amostras foram submetidas à imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes para diagnóstico de raiva. Após foram realizadas as análises de encéfalos e meninges por PCR em tempo real para Alfa herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoAHV-1 e BoAHV-5), nested PCR para Alfa herpesvírus ovino tipo-2 (OvHV-2) agente da febre catarral maligna e PCR para a família Babesiidae. Amostras positivas para OvHV-2 e Babesiidae foram submetidas ao sequenciamento genômico para determinação da espécie responsável pela infecção. Do total de 118 amostras recebidas, foram identificadas 51 amostras positivas exclusivamente para raiva, 3 amostras positivas para BoAHV-1, e 1 para BoAHV-5. Para OvHV-2, foram positivas 8 amostras apenas para esse agente e 34 amostras foram positivas para *Babesia* spp. Quanto às coinfeções, 8 amostras apresentaram coinfeção com *Babesia bovis* e raiva, 3 amostras positivas para *Babesia bovis* e OvHV-2, 1 amostra positiva para *Babesia bovis*, OvHV-2 e *imprint cerebral* para *Anaplasma marginale*, 1 amostra positiva para *Babesia bovis* e BoAHV-1, 3 amostras positivas para *Babesia bigemina* e raiva, 1 amostra positiva para *Babesia bigemina*, raiva, BoAHV-5 e *imprint cerebral* para *Anaplasma marginale*, e 1 amostra positiva para *Babesia bovis*, raiva e OvHV-2. Sendo assim, a maioria das amostras de encéfalos bovinos analisadas foi positiva para raiva, confirmando a relevância deste agente viral nas síndromes neurológicas de bovinos. No entanto, a identificação de outros agentes, como BoAHV-1, BoAHV-5, OvHV-2 e *Babesia* spp., evidencia a ocorrência de infecções múltiplas e coinfeções que contribuem para os quadros neurológicos observados. Estes achados ressaltam a importância de ampliar o escopo diagnóstico para agentes virais e parasitários além da raiva, visando um entendimento mais abrangente das enfermidades neurológicas que afetam bovinos e causam significativos impactos econômicos na pecuária brasileira.

Palavras-chave: enfermidades; sistema nervoso central; raiva; alfa herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoAHV-1 e BoAHV-5); alfa herpesvírus ovino tipo-2 (OvHV-2).

ABSTRACT

Central nervous system diseases are commonly reported in cattle and constitute a group of fatal diseases characterized by a set of clinical signs, including neurological disorders, thereby causing substantial economic losses to the livestock industry in Brazil. This study aimed to investigate the main viral and parasitic agents in cattle brains submitted for rabies diagnosis to the Desidério Finamor Institute of Veterinary Research (IPVDF). A total of 118 cattle brains submitted in 2019 for rabies diagnosis at IPVDF were analyzed, including samples from the cortex, cerebellum, medulla, and, when present, the meninges. The samples were subjected to direct immunofluorescence and intracerebral inoculation in suckling mice for rabies diagnosis. Subsequently, brain and meningeal samples were analyzed by real-time PCR for Bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 (BoAHV-1 and BoAHV-5), nested PCR for Ovine alphaherpesvirus type-2 (OvHV-2), the causative agent of malignant catarrhal fever, and PCR for the family Babesiidae. Samples positive for OvHV-2 and Babesiidae were subjected to genomic sequencing to determine the species responsible for infection. Of the 118 samples received, 51 samples were positive exclusively for rabies, 3 samples were positive for BoAHV-1, and 1 for BoAHV-5. For OvHV-2, 8 samples were positive solely for this agent, and 34 samples were positive for Babesia spp. Regarding co-infections, 8 samples showed co-infection with Babesia bovis and rabies, 3 samples were positive for Babesia bovis and OvHV-2, 1 sample was positive for Babesia bovis, OvHV-2, and cerebral imprint for Anaplasma marginale, 1 sample was positive for Babesia bovis and BoAHV-1, 3 samples were positive for Babesia bigemina and rabies, 1 sample was positive for Babesia bigemina, rabies, BoAHV-5, and cerebral imprint for Anaplasma marginale, and 1 sample was positive for Babesia bovis, rabies, and OvHV-2.

Thus, most cattle brain samples analyzed were positive for rabies, confirming the relevance of this viral agent in cattle neurological syndromes. However, the identification of other agents, such as BoAHV-1, BoAHV-5, OvHV-2, and Babesia spp., highlights the occurrence of multiple infections and co-infections that contribute to the observed neurological conditions. These findings emphasize the importance of expanding the diagnostic scope to include viral and parasitic agents beyond rabies, aiming for a more comprehensive understanding of neurological diseases affecting cattle and causing significant economic impacts on Brazilian livestock farming.

Keywords: *diseases; central nervous system; rabies; bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 (BoAHV-1 and BoAHV-5); ovine alphaherpesvirus type-2 (OvHV-2).*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** — Comparativos dos resultados das técnicas de análise molecular (PCR) de encéfalo e o diagnóstico direto dos positivos para esta técnica (*imprint cerebral*). 35
- Tabela 2** — Comparação entre os métodos de PCR no encéfalo e na meninge e método de *imprint cerebral*. 36
- Tabela 3** — Representação dos resultados dos patógenos testados juntamente com o número de amostras positivas e o percentual correspondente do total de amostras positivas. 37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** — Mapa do Brasil à esquerda, com o estado do Rio Grande do Sul destacado em vermelho, e as 68 cidades de origem das amostras enviadas ao IPVDF para diagnóstico de raiva, também em vermelho, à direita. 30
- Figura 2** — Ilustração de forma esquemática de todo o processo, desde a confecção da lâmina até a análise microscópica e o registro detalhado dos resultados obtidos. 31
- Figura 3** – Fluxograma do processo de extração de DNA e diagnóstico molecular. Amostras de cérebro, cerebelo, medula e meninges são processadas para detectar Raiva, OvHV-2, *Babesia sp.*, BoHV-1 e BoHV-5 por PCR convencional e em tempo real.....34

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** — Distribuição das 118 amostras submetidas ao *imprint cerebral*, destacando os resultados positivos (5%), negativos (46%), não realizados (45%) e impróprios (4%) para análise. 36
- Gráfico 2** — Representação gráfica mostrando a quantidade de tecidos cerebrais analisados para diferentes tipos de coinfeções. 39

LISTA DE ABREVIADURAS

AIHV-1	Alfaherpesvírus acefalino tipo 1
BLAST	Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais
BoAHV-1	Alfaherpesvírus bovino tipo-1
BoAHV-5	Alfaherpesvírus bovino tipo-5
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Trifosfatos de desoxinucleotídeos
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FCM	Febre Catarral Maligna
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFD	Imunofluorescência Direta
IHC	Imuno-histoquímica
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
mRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Multiplex
OvHV-2	Alfaherpesvírus ovino tipo-2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RabV	Vírus da raiva
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rRNA	RNA ribossomal
RS	Rio Grande do Sul
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Síndrome Respiratória Aguda
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TPB	Tristeza Parasitária Bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS GERAIS	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM BOVINOS	19
3.1.1	TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA	19
3.1.1.1	Diagnóstico para babesiose cerebral.....	21
3.1.2	Raiva	22
3.1.2.1	Diagnóstico para raiva bovina	24
3.1.3	Alfaherpesvírus bovino tipo-1 e tipo-5	25
3.1.3.1	Diagnóstico para alfaherpesvírus bovino tipo-1 e tipo-5.....	26
3.1.4	Febre Catarral Maligna	27
3.1.4.1	Diagnóstico para Febre Catarral Maligna.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	RECEPÇÃO DAS AMOSTRAS.....	30
4.2	DIAGNÓSTICO DE ROTINA PARA TPB E RAIVA BOVINA.....	30
4.3	DIAGNÓSTICOS MOLECULARES UTILIZADOS	31
5	RESULTADOS	35
5.1	<i>IMPRINT CEREBRAL</i> E REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE (PCR) ...	35
5.2	PCR DOS AGENTES VIRAIS E PARASITÁRIOS.....	37
5.3	COINFECÇÕES	38
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina representa um dos pilares do agronegócio brasileiro, desempenhando um papel central na economia nacional. Dados recentes indicam que o Brasil detém o segundo maior rebanho bovino global, com cerca de 220 milhões de cabeças, enquanto o estado do Rio Grande do Sul (RS) possui aproximadamente 12 milhões de bovinos, posicionando-se como o 7º maior rebanho bovino do país (IBGE, 2023). A relevância econômica, histórica e cultural da bovinocultura no RS é substancial, sendo a pecuária de corte a mais significativa dentro desse contexto. A otimização do potencial pecuário requer um conhecimento aprofundado das enfermidades que acometem o rebanho bovino na região (LUCENA et al., 2010).

As patologias do Sistema Nervoso Central (SNC) em bovinos representam um grupo de doenças de grande importância, caracterizadas por distúrbios neurológicos variados e inespecíficos, que frequentemente se manifestam em surtos e possuem um prognóstico frequentemente fatal. A sobreposição sintomática entre essas condições representa um desafio significativo para o diagnóstico diferencial (SANCHES et al., 2000; RIBAS et al., 2013). A precisão diagnóstica nessas doenças tornou-se ainda mais crucial, especialmente após a identificação da encefalopatia espongiiforme bovina como uma ameaça substancial à saúde animal e humana, alinhando-se com os padrões internacionais de saúde animal (OLIVEIRA et al., 2016).

Entre as síndromes neurológicas prevalentes em bovinos, destacam-se as doenças inflamatórias de origem viral, parasitológica e bacteriana, além das condições degenerativas, circulatórias, congênitas e neoplásicas. As infecções virais mais frequentemente diagnosticadas incluem a raiva, a meningoencefalite por alfa herpesvírus bovino e a febre catarral maligna. Além disso, a babesiose cerebral é uma condição parasitológica particularmente relevante, sendo comum no Rio Grande do Sul, e suas manifestações clínicas podem ser confundidas com outras síndromes neurológicas (QUEIROZ et al., 2018).

Para a aplicação de estratégias de controle eficazes, é importante diferenciar a raiva de outras patologias que afetam o SNC, conforme discutido na literatura (SILVA et al., 2022). As manifestações clínicas associadas a vírus, como os alfa herpesvírus bovinos, podem se apresentar tanto após a infecção primária quanto a partir da reativação viral. Estudos demonstraram que a coinfeção com o vírus da febre catarral maligna pode complicar o diagnóstico e o manejo dessas condições, evidenciando a complexidade do controle das doenças neurológicas em bovinos (SILVA et al., 2022; MARTINS et al., 2017).

As manifestações clínicas associadas à *Babesia bovis* podem ser ainda mais complicadas pela coinfeção com outros agentes virais, como os alfa herpesvírus bovinos e o vírus da febre catarral maligna. Estudos recentes evidenciam que a coinfeção com *Babesia bovis* e outros vírus

pode gerar um quadro clínico mais complexo e desafiador para o diagnóstico e manejo (SILVA et al., 2022; MARTINS et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Detectar diferentes agentes etiológicos de síndromes neurológicas em bovinos através de técnicas de biologia molecular e possíveis coinfeções, assim como uma comparação entre a técnica de *imprint cerebral* e a detecção molecular para babesiose cerebral no rebanho bovino do Rio Grande do Sul.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar diferentes agentes etiológicos associados a síndromes neurológicas em bovinos, investigar possíveis coinfeções e comparar a eficácia da técnica de *imprint cerebral* com a detecção molecular para babesiose cerebral no rebanho bovino do Rio Grande do Sul.
- Detectar os agentes alfa herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoAHV-1; BoAHV-5) e do vírus da febre catarral maligna em amostras neurológicas submetidas ao diagnóstico de raiva bovina no IPVDF no ano de 2019.
- Avaliar a presença de coinfeção entre os agentes.
- Analisar diferentes tecidos (meninges e os encéfalos) para a detecção de babesiose cerebral e dos agentes virais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM BOVINOS

3.1.1 TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

A família Babesiidae é um grupo taxonômico dentro do filo Apicomplexa, que inclui parasitas conhecidos por infectar células sanguíneas de mamíferos, aves e répteis (MEHLHORN & SCHEIN, 1984). Os membros dessa família são transmitidos principalmente por carrapatos e são os causadores da babesiose, uma doença importante em animais domésticos e, ocasionalmente, em humanos (HUNFELD et al., 2008). Dentro do mesmo filo, a família Anaplasmataceae, inclui o agente *Anaplasma marginale* inclui várias bactérias intracelulares obrigatórias que infectam células de mamíferos, principalmente eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Essa família também inclui outros gêneros importantes como *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (DUMLER et al., 2001).

As principais doenças em bovinos transmitidas por carrapatos pertencem ao complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) que compreende duas enfermidades bem conhecidas: a babesiose e a anaplasmosse. A babesiose é causada pelos agentes *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, ambos transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e a anaplasmosse é causada pelo *Anaplasma marginale*, bactéria transmitida por picada de carrapatos e insetos hematófagos e via iatrogênica e transplacentária (ALMEIDA et al., 2006; GUEDES JÚNIOR et al., 2008). Tais agentes parasitam as hemácias dos bovinos (hemoparasitos), e a doença pode ser causada por um, dois ou os três agentes juntos (SACCO, 2002; SANTOS, 2013; FERREIRA, 2019, TURRUELLA et al., 2020).

Babesia bovis é conhecida como pequena babésia devido ao seu tamanho relativamente menor em comparação com outras espécies de *Babesia*, como *Babesia bigemina*, que é chamada também de grande babésia (KATZ & HENNEMAN, 2000), medindo menos de três micrômetros de comprimento, podendo ser inoculada nos bovinos por larvas do carrapato, já no primeiro dia do parasitismo, com período pré-patente (incubação) de 6 a 12 dias. Este agente é considerado o mais patogênico dentre os agentes da Tristeza Parasitária Bovina, por causar manifestações nervosas em decorrência da hipóxia e inflamação determinada pela presença dos parasitas nos capilares cerebrais. Os eritrócitos parasitados por *Babesia bovis* apresentam uma alteração na superfície da membrana citoplasmática que promove a aderência da célula parasitada ao endotélio vascular (MARTINS & CORRÊA, 1995; MONTEIRO, 2010). O quadro clínico conhecido como babesiose cerebral ou nervosa, é caracterizado por sinais de incoordenação motora, andar cambaleante, opistótono, cegueira, andar em círculos, pressão da cabeça contra objetos, movimentos de

pedalagem, ataxia, agressividade e coma. Nos casos de infecção por *Babesia bovis*, o animal pode levar a alterações no Sistema Nervoso Central devido à anemia grave e hipoxia (falta de oxigênio nos tecidos). A hipoxia pode afetar a função cerebral e causar sintomas neurológicos (TATE & BEEL, 2004). Em casos graves, a infecção pode levar a uma letargia extrema ou até mesmo ao coma, devido à falência múltipla dos órgãos e ao comprometimento do SNC (LOPES & SILVA, 2008).

Babesia bigemina é conhecida também como a grande babésia pelas suas dimensões, medindo de 3 a 5 micrômetros de comprimento por dois de largura (KESSLER et al., 1998). O parasita invade e multiplica-se dentro das células vermelhas do sangue e sua presença dentro dos eritrócitos causa alterações na membrana celular e fragilidade dos glóbulos vermelhos (BOCK et al., 2004; SHKAP et al., 2008). A destruição dos glóbulos vermelhos leva a uma anemia grave, uma das principais manifestações clínicas da infecção. A anemia resulta em fraqueza, palidez e redução da capacidade de transporte de oxigênio no sangue (JONGEJAN & UILENBERG, 2004). Em casos graves de anemia intensa, este agente pode levar a complicações como choque hipovolêmico, insuficiência renal e morte, especialmente em animais não tratados ou em rebanhos com alta carga parasitária (BOCK et al., 2004).

Anaplasma marginale é um patógeno intracelular que infecta também os eritrócitos dos bovinos. A infecção leva à destruição desses glóbulos vermelhos, resultando em anemia. O parasita causa danos aos eritrócitos, que são removidos e destruídos pelo sistema reticulo endotelial, especialmente pelo baço e fígado (BOCK et al., 2004; NORVAL et al., 1992). A icterícia é comumente encontrada na anaplasmosose, a intensa destruição das hemácias aumenta a produção biliar, causando distensão na vesícula pela presença de bile espessa e grumosa ('mal da bile'). A insuficiência hepática permite a passagem de sais e ácidos à circulação, que podem determinar uma toxemia. As alterações da bile favorecem as disfunções digestivas que terão como consequências hepatoesplenomegalia, icterícia, coprostasia ou diarreia, dentre outros distúrbios (MASSARD et al., 1998).

Os sinais clínicos variam dependendo da espécie e da virulência da cepa do parasito, do inóculo e da sensibilidade do hospedeiro (raça e idade) (KESSLER et al., 1998; MARTINS e CORRÊA, 1995; MONTEIRO, 2010; RODRIGUES et al., 2005; WEISS e WARDROP, 2011).

Os animais, quando acometidos pela TPB, podem apresentar sinais clínicos como anorexia, pelos arrepiados, taquicardia, taquipneia, redução dos movimentos ruminais, anemia, prostração, redução da lactação e icterícia.

O clima subtropical do Rio Grande do Sul proporciona um ambiente favorável para a proliferação dos carrapatos vetores, aumentando a incidência de babesiose. A umidade e as temperaturas moderadas contribuem para a sobrevivência e reprodução dos carrapatos, facilitando

a transmissão de *Babesia bovis* (KESSLER et al., 2015). Estudos na região indicam que a babesiose cerebral é uma preocupação significativa para os pecuaristas, com impacto na saúde do rebanho e na economia local (LOPES et al., 2021).

A babesiose cerebral pode ocorrer em várias regiões do Rio Grande do Sul, particularmente em áreas onde o controle de carrapatos é insuficiente. A taxa de ocorrência deste agente pode variar de acordo com a intensidade de infecção por carrapatos e a eficácia das práticas de manejo (KESSLER et al., 2015). A prevalência exata deste agente especificamente pode ser difícil de quantificar, pois muitos estudos focam na babesiose bovina em geral, sem distinguir a forma cerebral. No entanto, estudos mostram que a babesiose bovina, causada principalmente por *Babesia bovis* associada a sinais clínicos neurológicos e *Babesia bigemina*, é endêmica em muitas áreas do Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2016; DALL'AGNOL et al., 2012).

3.1.1.1 Diagnóstico para babesiose cerebral

O diagnóstico clínico de babesiose baseia-se na observação dos sinais clínicos característicos, como febre alta, anemia, icterícia e sinais neurológicos nos casos de babesiose cerebral. No entanto, esses sinais podem ser semelhantes a outras doenças hemoparasitárias, exigindo confirmação laboratorial (RISTIC & LEVY, 1981).

O exame microscópico de esfregaços de sangue é um dos métodos mais comuns para a detecção de *Babesia bovis*. Nesse método, esfregaços de sangue periférico são corados com Giemsa - Wright, e os parasitas são identificados dentro dos eritrócitos. *Babesia bovis* aparece como pequenos corpúsculos em forma de anel ou de pêra dentro das células vermelhas (KESSLER et al., 2015). Porém, a sensibilidade do diagnóstico microscópico pode ser baixa, especialmente em infecções leves ou crônicas, e o método exige habilidade técnica (SILVA et al., 2016).

Testes sorológicos, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), são usados para detectar anticorpos contra *Babesia bovis*. Esses testes são úteis para diagnóstico em rebanhos e para estudos epidemiológicos, mas podem não distinguir entre infecções ativas e passadas (BOCK et al., 2004).

Métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm se mostrado altamente sensíveis e específicos para a detecção de *Babesia bovis*. A PCR pode detectar o DNA do parasita no sangue mesmo em casos de baixa parasitemia, o que torna esse método muito útil em situações em que o diagnóstico microscópico falha (BULING et al., 2007). A PCR em tempo real (qPCR) é uma variação que permite a quantificação da carga parasitária, oferecendo uma ferramenta valiosa para monitorar a eficácia do tratamento (BOCK et al., 2004).

3.1.2 Raiva

A raiva é uma doença que acomete mamíferos, e é causada por um vírus RNA da ordem Mononegavirales, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* e espécie *Lyssavirus rabies*. Na família *Rhabdoviridae*, existe um amplo número de espécies de vírus que infectam animais vertebrados (mamíferos, peixes e répteis), invertebrados e plantas, o que demonstra a grande diversidade desses vírus (ICTV, 2008). O genoma do RabV (*Rabies virus*) é formado por uma fita simples de RNA com polaridade negativa e codifica cinco proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase dependente de RNA (L). O RNA do RabV é envolto pela nucleoproteína (N), este conjunto forma um nucleocapsídeo helicoidal, com o RNA e a proteína N unidos, já a proteína G do RabV é isolada na superfície viral, sendo responsável pela patogenicidade do vírus (BANERJEE, 1987; ISENI et al., 1998; ALBERTINI et al. 2011; ZHU e GUO, 2016).

O RabV é envelopado, sendo sensível a detergentes e solventes lipídicos (éter, clorofórmio). É rapidamente inativado a temperaturas altas, sendo destruído a 50 °C durante 15 minutos; não é viável fora do hospedeiro e pode ser inativado pela luz solar, calor e dessecação. Para se manter viável deve ser mantido a -70 °C ou temperaturas mais baixas. O RabV é considerado um vírus bastante estável em laboratório, sendo ainda hoje utilizadas amostras de vírus vacinais derivadas do agente isolado por Pasteur no final do século XIX (LEUNG et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2007).

A classificação das linhagens do vírus tem sido um aspecto crucial para a o monitoramento e controle da raiva. A nomenclatura baseia-se em estudos filogenéticos e análises genéticas das variantes do RabV. As linhagens foram atualizadas para melhorar a precisão na identificação e rastreamento dos vírus em diferentes regiões e hospedeiros (SMITH et al., 2020):

- *Arctic Fox Lineage* - agora pode ser referida como **Arctic-1** ou **Linhagem A1**.
- *Raccoon Dog Lineage* - atualizada para **Asia-1** ou **Linhagem A2**.
- *Vampire Bat Lineage* - muitas vezes identificada como **Latin America-1** ou **Linhagem B1**.

Ainda SMITH et al. (2020) citam que cada linhagem do vírus da raiva possui sublinhagens que são classificadas com base em diferenças genéticas mais sutis, úteis em estudos epidemiológicos, ajudando a rastrear a origem e a propagação do vírus em diferentes regiões e populações de hospedeiros. São identificadas conforme a descrição abaixo:

1. *Arctic-1* (**Linhagem A1**)
 - Sublinhagens: **A1a, A1b**
2. *Asia-1* (**Linhagem A2**)

- Sublinhagens: **A2a, A2b**
- 3. *Latin America-1 (Linhagem B1)*
- Sublinhagens: **B1a, B1b**

Na América Latina, o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é o principal vetor da raiva para bovinos. Estes morcegos se alimentam de sangue de animais, incluindo o gado, e são altamente eficientes na transmissão do vírus, pois uma única mordida pode ser suficiente para infectar um animal (SCHNEIDER et al., 2009). Importante destacar que, a raiva é endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem a proliferação dos morcegos hematófagos e a sobrevivência do vírus. As áreas com alta densidade de gado e pouca infraestrutura para controle de doenças tendem a ser mais afetadas (FAVI & YUNG, 2018). Schneider et al., 2009, complementam que as temperaturas altas e umidade elevada são condições que favorecem a atividade dos morcegos hematófagos, aumentando o risco de transmissão do vírus da raiva para o gado (SCHNEIDER et al., 2009).

Os sinais clínicos da raiva em bovinos geralmente começam com mudanças sutis de comportamento, como isolamento do rebanho, inquietação, hipersalivação e coceira no local da mordida, que caracterizam a fase prodrômica e duram geralmente de 2 a 3 dias (MESLIN & BRIGGS, 2013). À medida que a doença progride, os bovinos entram em uma fase excitativa, apresentando sinais neurológicos evidentes, como hiperexcitabilidade, agressividade, paralisia faríngea (dificuldade em engolir), marcha cambaleante, vocalização anormal e comportamento errático (SCHNEIDER et al., 2009). Finalmente, a doença avança para uma fase paralítica, onde os animais desenvolvem paralisia flácida, tremores musculares, incapacidade de se levantar, seguidos de coma e morte. A maioria dos bovinos sucumbe à infecção dentro de 7 a 10 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (FAVI & YUNG, 2018).

A raiva é uma preocupação significativa em várias regiões do Rio Grande do Sul, principalmente nas áreas rurais e periurbanas. A distribuição da raiva é amplamente influenciada pela presença de *D. rotundus*, que são os principais reservatórios do vírus. O estado tem enfrentado surtos intermitentes de raiva, especialmente em municípios com baixa cobertura vacinal e controle inadequado de populações de animais selvagens e domésticos (GONÇALVES et al., 2020). Essa situação torna a vacinação contra a raiva em bovinos uma medida crucial para a prevenção da doença. Embora a vacina antirrábica seja eficaz e amplamente recomendada, sua aplicação não é obrigatória em todo o território brasileiro, sendo que a vacinação anual é sugerida, especialmente em áreas endêmicas (SOUZA et al., 2018).

Municípios com grande concentração de pecuária e presença de morcegos hematófagos são particularmente vulneráveis. As regiões afetadas frequentemente incluem áreas remotas com menor

acesso aos serviços veterinários e controle de vetores (SILVA et al., 2021). O estado tem enfrentado surtos, especialmente em municípios com baixa cobertura vacinal e controle inadequado de populações de animais selvagens e domésticos.

3.1.2.1 Diagnóstico para raiva bovina

O diagnóstico clínico da raiva em bovinos pode ser desafiador devido à semelhança dos sinais clínicos com outras doenças neurológicas. Bovinos infectados apresentam sinais como alterações comportamentais, paralisia, salivação excessiva, e dificuldades de deglutição (SCHNEIDER et al., 2009). No entanto, devido à sobreposição de sintomas com outras enfermidades neurológicas, como a encefalite causada por alfa herpesvírus bovino tipo-1 (BoAHV-1) e tipo-5 (BoAHV-5) e a listeriose, é essencial a confirmação laboratorial para um diagnóstico definitivo (FAVI & YUNG, 2018). Spilki et al., 2005, ainda contribuem com a informação que a encefalite por alfa herpesvírus bovino tipo-1 (BoAHV-1) e tipo-5 (BoAHV-5) podem apresentar sinais clínicos semelhantes, como paralisia e alterações comportamentais, com diagnóstico diferencial realizado através da detecção de DNA viral via PCR. A febre catarral maligna (FCM), causada pelo alfa herpesvírus ovino tipo-2 (OvHV-2), também pode causar sinais neurológicos, além de lesões oculares e orais características (LUCHSINGER et al., 2011). Essas doenças devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da raiva em bovinos, sendo essenciais os testes laboratoriais específicos para confirmação diagnóstica e tratamento adequado.

O diagnóstico da raiva em bovinos pode ser realizado por diversos métodos, cada um com suas características e aplicações específicas. O teste de imunofluorescência direta (IFD) é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da raiva, envolvendo a aplicação de anticorpos fluorescentes específicos para o vírus da raiva em amostras de tecido cerebral, geralmente do hipocampo e do cerebelo, permitindo a detecção de antígenos virais com alta especificidade e rapidez (MESLIN & BRIGGS, 2013).

A inoculação intracerebral em camundongos lactantes é um método indicado principalmente para a pesquisa de agentes patogênicos, como o vírus da raiva, e para a avaliação da eficácia de vacinas, conforme destacado por Meyer (2001). Nesse procedimento, amostras de tecido cerebral são inoculadas em camundongos, e a observação de sinais clínicos de raiva, seguida pela confirmação por imunofluorescência direta (IFD), é considerada diagnóstica. Embora sensível, esse teste é mais demorado e menos utilizado atualmente devido à sua natureza invasiva (SCHNEIDER et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes, como a PCR em tempo real, têm se tornado cada vez mais comuns no diagnóstico da raiva devido à sua alta sensibilidade e

especificidade, permitindo a detecção do material genético do vírus em amostras de tecido cerebral, sendo útil para confirmar resultados de IFD ou em casos em que a IFD é inconclusiva (FAVI & YUNG, 2018).

Além disso, o exame histopatológico do tecido cerebral pode revelar a presença de corpúsculos de inclusão de Negri, patognomônicos para a raiva, embora sua ausência não exclua o diagnóstico, pois nem sempre estão presentes em todas as amostras. A histopatologia é frequentemente usada como complemento aos testes de IFD e PCR (MESLIN & BRIGGS, 2013).

3.1.3 Alfaherpesvírus bovino tipo-1 e tipo-5

Alfaherpesvírus bovino tipo 1 (BoAHV-1) e tipo 5 (BoAHV-5) são vírus com genoma de DNA fita dupla, envelopados, pertencentes à família *Orthoherpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2020). Esses vírus são responsáveis por várias manifestações clínicas que incluem rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular, balanopostite pustular, abortos, conjuntivite, forma sistêmica neonatal e meningoencefalite (FRANCO & ROEHE, 2007).

Inicialmente todos os casos de doença neurológica foram associados ao BoAHV-1 e, após alguns estudos, foram observadas diferenças biológicas e antigênicas do agente, classificando-o em três subtipos: 1 - causando doença respiratória, 2 - doença reprodutiva e, 3 - doença neurológica. Só em 1992 que, pelas suas características genotípicas distintas, renomearam a cepa neurotrópica como BoAHV-5 (ROIZMAN et al., 1992; FRANCO & ROEHE, 2007).

BoAHV-1 tem como característica ser o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), os sinais clínicos envolvem tanto o sistema respiratório (rinotraqueíte infecciosa viral) quanto o sistema reprodutor (vulvovaginite pustular e balanopostite infecciosa), levando a abortos espontâneos e infertilidade. Além disso, o vírus também é conhecido por causar supressão imunológica, conjuntivite, encefalite e queda na produção de leite (CARELLA et al., 2023).

BoAHV-5 causa meningoencefalite em animais jovens (acima de 8 meses), cujo curso é rápido e, muitas vezes, fatal. Esta doença neurológica causa várias manifestações clínicas que incluem: anorexia; fraqueza; e sinais neurológicos, como incoordenação, tremor muscular, cegueira, andar em círculos, decúbito, pressão de cabeça, convulsões e morte (ELY et al., 1996; MEGID et al., 2015). Ocasionalmente, o BoAHV-5 mostrou estar associado a distúrbios reprodutivos em fêmeas afetadas (KIRKLAND et al., 2009; FAVIER ET et al, 2012).

Arruda et al. (2010), destacam que a forma neurológica é atribuída ao BoAHV-5, enquanto as demais manifestações costumam ser causadas pelo BoAHV-1, porém ambos podem causar doença neurológica de difícil diferenciação clínica (SILVA et al., 2007; LUNARDI et al., 2009;

ARRUDA et al., 2010). Os dois vírus apresentam características biológicas, moleculares e estruturais muito similares, porém possuem algumas diferenças genéticas e imunogênicas que estão relacionadas às particularidades de cada um tipo viral em relação à sua patogenicidade e epidemiologia (FRANCO & ROEHE, 2007).

Bovinos infectados com BoAHV-1 frequentemente se tornam portadores latentes, com o vírus estabelecendo-se em tecidos neurais, particularmente nos gânglios trigeminiais, onde pode ser reativado em períodos de estresse (WINKLER et al., 2000). Em bovinos infectados com BoAHV-5 a latência ocorre principalmente, nos neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos dos animais infectados (THIRY et al., 2005; FRANCO & ROEHE, 2007). Apesar desses locais serem os sítios mais comuns de latência, DNA viral de BoAHV-1 já foi encontrado em centros germinativos das tonsilas faríngeas (WINKLER et al., 2000), linfonodos e baço (MWEENE et al., 1996). O DNA de BoAHV-5 foi também detectado em várias áreas do Sistema Nervoso Central, principalmente córtex, tálamos, mesencéfalo e ponte encefálica (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). Além do sistema nervoso as mucosas nasal e traqueal já foram propostas como possíveis sítios de latência de BoHV-5 (MEYER et al., 2001).

BoAHV-1 e BoAHV-5 continuam a representar desafios significativos para a bovinocultura no Rio Grande do Sul. Estudos recentes revelam que BoAHV-1 permanece na região com surtos frequentes de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em rebanhos. A pesquisa realizada por Silva et al. (2022) destacou que, apesar dos esforços de controle e vacinação, a infecção por BoAHV-1 ainda resulta em sintomas respiratórios graves e problemas reprodutivos. A persistência do vírus em rebanhos sugere a necessidade de novas estratégias de controle, incluindo a atualização das vacinas e melhorias nas práticas de manejo (LOPES et al., 2023). Por outro lado, BoAHV-5 tem sido associado a surtos de meningoencefalite necrosante, com alta taxa de mortalidade e manifestações neurológicas severas, como incoordenação e convulsões (FERREIRA et al., 2023). A pesquisa também revelou que a alta densidade de bovinos e práticas inadequadas de manejo contribuem para a disseminação do vírus, recomendando a intensificação das medidas de biossegurança e a revisão das estratégias de vacinação para melhorar o controle da infecção (SANTOS et al., 2023). Estas descobertas ressaltam a importância de estratégias contínuas e adaptativas para o manejo e controle de BoAHV-1 e BoAHV-5 na região.

3.1.3.1 Diagnóstico para alfa herpesvírus bovino tipo-1 e tipo-5

O diagnóstico das infecções pelo alfa herpesvírus bovinos tipo-1 (BoAHV-1) e tipo-5 (BoAHV-5) envolve a utilização de várias técnicas laboratoriais avançadas. ROEHE (2012) descreve que o isolamento viral em culturas de células, como as células MDBK, é uma abordagem

para a identificação desses vírus. Após o isolamento, os testes imunofluorescentes confirmam a presença do vírus. A reação em cadeia da polimerase (PCR), tanto em tempo real quanto convencional, é eficaz na detecção do DNA viral, como detalhado por FURLAN et al. (2012). Os testes sorológicos, incluindo ELISA *imprint cerebral* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e imunofluorescência indireta (IFA), são utilizados para identificar anticorpos específicos contra BoAHV-1 e BoAHV-5. Essas técnicas proporcionam uma abordagem abrangente para o diagnóstico preciso e a gestão das infecções por alfaherpesvírus bovinos.

3.1.4 Febre Catarral Maligna

A Febre Catarral Maligna (FCM) é causada pelos agentes etiológicos alfaherpesvírus ovino tipo-2 (OvHV-2) e o alfaherpesvírus alcelafino tipo-1 (AIHV-1), pertencentes ao gênero *Macavirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2020). A forma africana ou FCM gnu-associada (*Connochaetes taurinus* e *C. gnus*) é induzida pelo vírus alfaherpesvírus 1 (AIHV-1) e a FCM não associada a gnus ou FCM ovino-associada é causada pelo alfaherpesvírus ovino tipo-2 (PLOWRIGHT, 1990; ROIZMAN et al., 1981; BRIDGEN & REID, 1991; MURPHY et al., 1999; FRANCO & ROEHE, 2007).

Os vírus da FCM se replicam em linfócitos T e B. Causam doença linfoproliferativa e estabelecem latência em tecidos linfoides, e acabam induzindo manifestações clínicas e patológicas semelhantes, porém, existem diferenças epidemiológicas entre elas. Na FCM ovino-associada os ovinos são os reservatórios do OvHV-2, e os bovinos acabam desenvolvendo a doença linfoproliferativa (MURPHY et al., 1999; SMITH, 2002).

Os ovinos, principais reservatórios do FCM, geralmente não apresentam sinais clínicos, mas a transmissão para bovinos ocorre principalmente por contato direto ou indireto, especialmente durante o período de excreção viral em cordeiros jovens. A FCM ocorre geralmente em forma de surtos que podem ser observados em fazendas onde o manejo favorece o contato próximo entre bovinos e ovinos. A transmissão se dá principalmente por aerossóis ou secreções nasais de ovinos infectados para bovinos suscetíveis, com maior risco durante o inverno e primavera (KOCOWSKA, BROOKS & HAWKINS, 2023).

Os sinais clínicos do agente OvHV-2 em bovinos incluem uma ampla gama de sintomas. Estes variam desde febre alta e persistente, secreção ocular e nasal, até linfadenopatia generalizada. Lesões oculares, como opacidade córnea, podem progredir para cegueira, enquanto lesões ulcerativas na mucosa oral e nasal são frequentemente observadas (OLLIVIER, JORGENSEN & HURLEY, 2022). Sintomas neurológicos, como ataxia, convulsões e alterações comportamentais, refletem o envolvimento do sistema nervoso central na patogenia da FCM (PIERSON & ALLEN,

2021). Devido à semelhança com as doenças que afetam o Sistema Nervoso Central de bovinos no Brasil como raiva, meningoencefalite por alfa herpesvírus bovino tipo-1 e tipo-5 e doença de Aujeszky e outras doenças causadas por vírus como diarreia viral bovina/doença das mucosas língua azul, peste bovina, febre aftosa e estomatite vesicular o diagnóstico de FCM deve basear-se nos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos (FURLAN, F.H.; AMORIM, T.M.; JUSTO, R.V.; et al. 2012). Medidas de controle, como a separação física de ovinos e bovinos e a implementação de práticas de biossegurança, são essenciais para a gestão da doença (REED & ANDERSON, 2021).

A FCM é uma doença viral que afeta principalmente bovinos, e sua presença no Rio Grande do Sul tem sido objeto de estudo devido ao impacto na pecuária local. A epidemiologia da FCM no Rio Grande do Sul mostra que a doença está frequentemente associada a áreas onde há uma convivência próxima entre ovinos e bovinos, uma vez que os ovinos são os principais reservatórios do vírus. Em estudo recente, Ferreira et al. (2021) relataram surtos de FCM em bovinos em várias regiões do estado, com uma correlação direta entre a presença de ovinos e a incidência da doença. A transmissão do OvHV-2 dos ovinos para os bovinos ocorre geralmente por contato direto ou por meio da inalação de secreções nasais dos ovinos infectados, que são portadores assintomáticos do vírus.

Estudos recentes indicam que a FCM tem uma distribuição geográfica ampla no estado do Rio Grande do Sul, com casos relatados em várias regiões de pecuária intensiva. A alta densidade de ovinos e bovinos na mesma área é um fator de risco significativo para a transmissão do OvHV-2, resultando em surtos localizados de FCM (RODRIGUES et al., 2022). A epidemiologia da FCM no Rio Grande do Sul também aponta para um aumento na incidência em anos recentes, possivelmente relacionado a mudanças no manejo de rebanhos e na introdução de novas raças ovinas na região (SOUZA et al., 2023).

Furlan, A.; et al. (2005), identificaram ainda que a falta de quarentena adequada para novos animais e a movimentação frequente dos bovinos também aumentam o risco de transmissão. Além disso, o clima do Rio Grande do Sul, com alta umidade e temperaturas moderadas, cria um ambiente propício para a sobrevivência dos vetores e a persistência do vírus.

O diagnóstico da FCM no estado é um desafio devido à apresentação clínica variável e à necessidade de técnicas laboratoriais específicas, como PCR, para confirmação da infecção pelo OvHV-2. Além disso, a doença pode ser confundida com outras condições neurológicas e infecciosas que afetam os bovinos, tornando a vigilância e o diagnóstico precoce fundamentais para o controle da doença (FARIAS & LIMA, 2020).

3.1.4.1 Diagnóstico para Febre Catarral Maligna

O diagnóstico da Febre Catarral Maligna (FCM) no estado apresenta desafios significativos, principalmente devido à variabilidade clínica da doença e à necessidade de técnicas laboratoriais específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), para a confirmação da infecção pelo alfa herpesvírus tipo-2 (OvHV-2). Além disso, os sintomas da FCM podem se assemelhar aos de outras condições neurológicas e infecciosas que afetam os bovinos, o que torna a vigilância contínua e o diagnóstico precoce essenciais para o controle da doença. A complexidade do diagnóstico da FCM está relacionada a essa variabilidade clínica. Para a confirmação diagnóstica, a utilização de métodos laboratoriais específicos é fundamental (FARIAS & LIMA, 2020). A PCR, amplamente empregada na detecção do OvHV-2, permite a identificação do material genético do vírus em amostras de tecidos, como linfonodos, cérebro, fígado e baço, sendo considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da doença (LI et al., 2016; REID & FROST, 2015).

Além da PCR, a imuno-histoquímica (IHC) é uma ferramenta complementar no diagnóstico da FCM, especialmente quando há uma forte suspeita clínica. A IHC permite a detecção de antígenos virais em cortes histológicos de tecidos, ajudando a confirmar a presença do vírus nas lesões características da FCM. Essa técnica é particularmente valiosa quando o vírus é detectado em áreas focais (RUSSO et al., 2020).

A histopatologia também desempenha um papel importante na confirmação da FCM. As lesões histopatológicas típicas, como vasculite linfocítica, necrose multifocal e infiltrados linfocíticos, são observadas em tecidos afetados pela infecção. Essas alterações proporcionam evidências adicionais que, quando combinadas com os achados de PCR e IHC, podem fortalecer o diagnóstico da FCM. Embora a histopatologia possa não ser tão específica quanto as técnicas moleculares ou imunológicas, sua capacidade de revelar padrões de lesão característicos é útil para a confirmação diagnóstica (HEUSCHELE & REED, 2017).

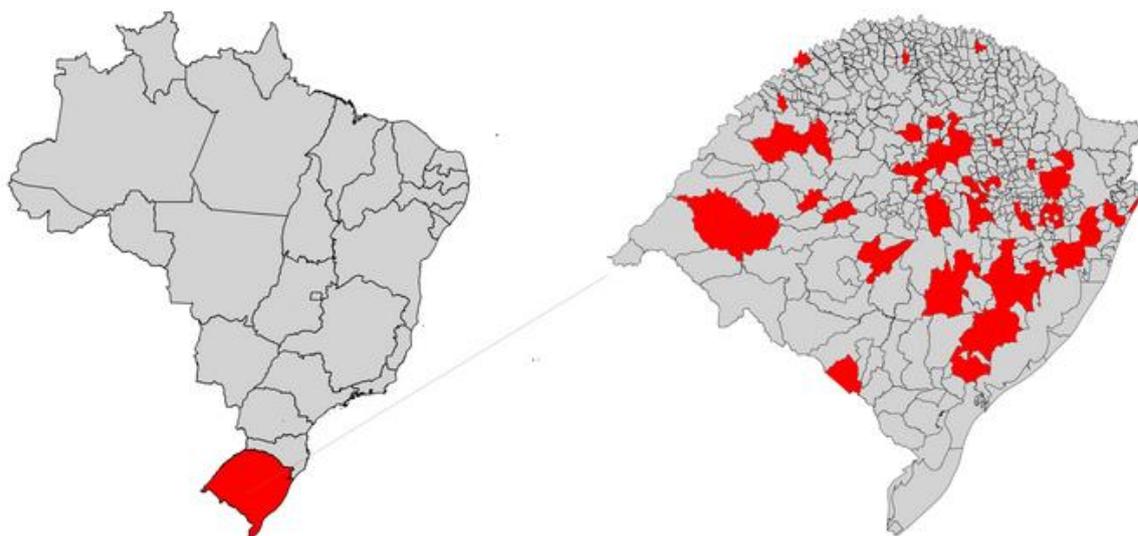
Além disso, a sorologia é empregada para a detecção de anticorpos contra o OvHV-2 em rebanhos expostos. No entanto, seu uso é mais restrito devido à dificuldade em diferenciar entre animais que estão efetivamente infectados e aqueles que foram expostos ao vírus de forma assintomática. A sorologia pode indicar exposição prévia, mas não é eficaz para o diagnóstico em estágios agudos da doença ou para distinguir entre infecção ativa e exposição passiva (SCHULTZ et al., 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 RECEPÇÃO DAS AMOSTRAS

Em 2019, o Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor conduziu um estudo sobre a raiva em bovinos, analisando 118 amostras de encéfalos provenientes de animais que apresentaram sintomas neurológicos. Essas amostras foram enviadas de 68 cidades diferentes do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1).

Figura 1 — Mapa do Brasil à esquerda, com o estado do Rio Grande do Sul destacado em vermelho, e as 68 cidades de origem das amostras enviadas ao IPVDF para diagnóstico de raiva, também em vermelho, à direita.



Fonte: A autora (2024).

4.2 DIAGNÓSTICO DE ROTINA PARA TPB E RAIVA BOVINA

O processo de confecção da lâmina foi realizado na cabine de segurança biológica (NB2) do setor de virologia. A lâmina é pressionada suavemente contra o encéfalo para transferir as células e outros componentes, como os parasitológicos para a superfície da lâmina. Após esse processo, a lâmina com o *imprint cerebral* foi pré-fixada com metanol para que rapidamente as células e estruturas presentes na lâmina sejam preservadas. Após a prefixação, a lâmina foi deixada secar à temperatura ambiente podendo também ser colocada em uma estufa, se necessário. Em seguida, a lâmina é enviada ao laboratório de parasitologia para aplicação cuidadosa de corantes que permitem evidenciar a presença de hemoparasitos, seguida pela observação minuciosa ao microscópio para identificação e contagem dos parasitos presentes pelo técnico devidamente habilitado. Além disso, o técnico também é responsável pela documentação precisa dos resultados dos parasitos encontrados (Figura 2).

Figura 2 — Ilustração de forma esquemática de todo o processo, desde a confecção da lâmina até a análise microscópica e o registro detalhado dos resultados obtidos.



Fonte: A autora (2024).

A imunofluorescência direta (IFD) foi realizada para detectar o antígeno da raiva bovina (RUPPRECHT et al., 2018a), e as amostras negativas com histórico de exposição humana foram submetidas ao teste da prova biológica (RUPPRECHT et al., 2018b).

4.3 DIAGNÓSTICOS MOLECULARES UTILIZADOS

Após a coleta das amostras de cérebro, fragmentos de 1 a 2 cm das regiões da medula oblonga, cerebelo e córtex foram colocados em placas de Petri e mantidos refrigerados (entre 2 e 8 °C). Em seguida, foi coletado 1 g de cada porção do tecido encefálico em tubos eppendorfs de 1,5 mL, cortado em pequenos fragmentos com lâminas estéreis, homogeneizado e congelado a -30 °C. Para os encéfalos que continham meninges, uma porção contendo vasos foi separada e congelada da mesma forma.

A extração de DNA foi realizada de acordo com as instruções do kit *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)*. Nos tubos contendo os tecidos, foram adicionados 180 µL de *PureLink™ Genomic Digestion Buffer*, seguidos por 20 µL de *PureLink™ Proteinase K*. Em seguida, os tubos foram incubados a 55 °C por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 3 minutos e 150 µL dos sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. A esses sobrenadantes, foram adicionados 20 µL de RNase A, as misturas foram vortexadas e incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos.

Subsequentemente, foram adicionados 200 µL de *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer* e 200 µL de etanol e os tubos foram novamente vortexados. A quantidade de 640 µL foi então transferido para colunas *PureLink™ Spin Column*, encaixadas em tubos coletores. As colunas foram centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto, e o eluido foi descartado. Para remover contaminantes adicionais, as colunas foram lavadas com Tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer 1*) e

Tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer 2*) respectivamente, seguidas por centrifugação a 12.000 x g por 3 minutos após cada lavagem, trocando os tubos coletores entre as etapas. Por fim, as colunas foram transferidas para novos tubos eppendorfs de 1,5 ml, e 50 µL de *PureLink™ Genomic Elution Buffer* foram adicionados. As colunas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto, liberando o DNA.

O DNA eluído foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, e a pureza das amostras foi monitorada através das razões de absorvância A260/A280 e A260/A230. As amostras que apresentaram concentrações de DNA fora da faixa recomendada foram ajustadas por meio de diluições, de forma a alcançar os níveis ideais de 30 ng necessários para as reações de PCR. Após o ajuste, as amostras foram reavaliadas para confirmar que estavam dentro das faixas de concentração e pureza apropriadas antes de serem utilizadas nas reações de PCR.

Para a investigação da Febre Catarral Maligna, foi empregada a técnica de hemi-nested PCR, conforme descrito por Martins et al. (2017). Foram utilizados os primers MCF 556 (5' GTC TGG GGT ATA TGA ATC CAG ATG GCT CTC 3'), MCF 755 (5' AAG ATA AGC ACC AGT TAT GCA TCT GAT AAA 3') e MCF 555 (5' TTC TGG GGT AGT GGC GAG

CGA AGG CTT C 3') para a detecção do OvHV-2.

Na primeira amplificação, a mistura de reação foi preparada adicionando 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM cada), 0,5 µL do primer MCF 556 (10 µM), 0,5 µL do primer MCF 755 (10 µM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 2 µL de DNA *template*, completando o volume com água livre de nucleases até atingir 25 µL. As condições de ciclagem para a primeira amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 3 minutos.

Para a segunda amplificação, a mistura de reação foi composta por 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM cada), 0,5 µL do primer MCF 556 (10 µM), 0,5 µL do primer MCF 555 (10 µM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase e 2 µL do produto da primeira amplificação, completando o volume com água livre de nucleases até 25 µL. As condições de ciclagem para a segunda amplificação incluíram desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 67°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 3 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). Foram carregados 5 µL do produto de PCR nos poços do gel, juntamente com o corante *Blue Green Loading Dye I*. Foram adicionados um marcador de peso molecular e amostras controle positivas e negativas para referência. A eletroforese foi conduzida 100 V por 30-45 minutos e posteriormente, os produtos amplificados foram visualizados sob luz

UV. Durante a preparação das reações de Nested PCR, todas as amostras e reagentes foram mantidos em gelo para preservar a integridade das amostras e reagentes. Além disso, foram utilizadas pipetas e pontas de pipeta livres de DNase para evitar qualquer risco de contaminação, assegurando a precisão dos resultados obtidos.

A detecção de BoAHV-1 e BoAHV-5 foi realizada por PCR em tempo real, seguiu o protocolo descrito por Rodenbusch et al. (2020). O para BoHV-1 e BoHV-5 foi padronizado utilizando as cepas referência COOPER e ISO95/97 previamente cultivadas *in vitro*. Essas cepas também foram utilizadas como controle positivo na análise por mRT-PCR das amostras de encefálico bovino. A detecção de BoHV-1 e BoHV-5 foi realizada utilizando os primers e sondas descritos por Diallo8 (*Applied Biosystems, Melbourne, Austrália*). As reações foram realizadas em um termociclador (*Step One Real Time PCR, Applied Biosystems, Austrália*) com 10 µL da solução de reagentes PCR (*Taqman™ Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Austrália*), 1 µL de cada primer a 20 µM, 1 µL de cada sonda a 2.5 µM, e água livre de DNase para completar o volume final de 20 µL. O programa de ciclagem incluiu um ciclo inicial de desnaturação de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos a 95 °C (5 s) e 60 °C (15 s). A sensibilidade analítica do mRT-PCR para detectar BoHV-1 e BoHV-5 em encefálico bovino foi determinada desafiando amostras negativas de encefálico para BoHV-1 e BoHV-5 com as cepas virais de referência previamente cultivadas *in vitro* e tituladas.

Após as análises das lâminas contendo os *imprints cerebrais*, foi realizada a análise molecular por PCR para detecção de *Babesia spp.* nos cérebros e das meninges, com o objetivo de realizar um estudo comparativo entre esses dois métodos diagnósticos. A detecção para estes agentes foi realizada utilizando PCR, utilizando os primers BAB143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') e BAB649-667 (5'-

GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG-3'), visando amplificar um fragmento de 500 bp do gene 18S rRNA específico da família Babesiidae, conforme descrito por Soares et al. (2011).

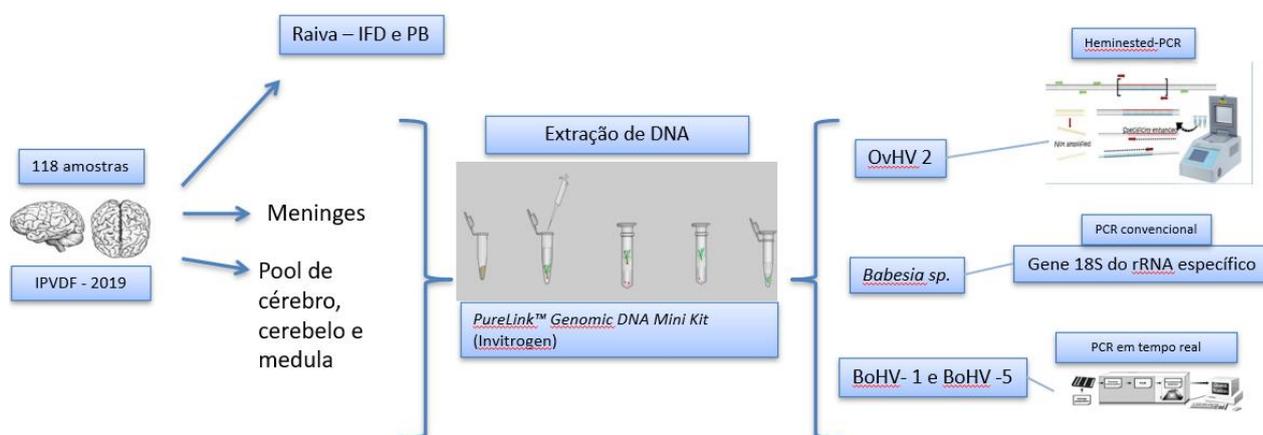
A mistura de reação foi preparada em tubos de PCR, contendo: 2,5 µL de tampão de reação 10X, 0,5 µL de dNTP a 1,0 mM, primers específicos para *Babesia bovis*, 0,75 mM de MgCl₂, 0,10 µL de Taq DNA polimerase e 1 µL de *DNA template*), água livre de DNase e RNase foi utilizada para completar o volume final da reação para 25 µL. Foram ainda utilizadas pontas de pipeta livres de DNase para evitar qualquer risco de contaminação

A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 63 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. A extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE. Foram carregados 5 µL do produto de PCR nos poços do gel, juntamente com o corante Blue Green *Loading Dye I*. Além

disso, foram adicionados um marcador de peso molecular e amostras controles positivas e negativas para referência. A eletroforese foi conduzida a 100 V por 30-45 minutos e posteriormente, os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV. Todas as amostras e reagentes foram mantidos em gelo para preservar a integridade das amostras e reagentes. Além disso, foram utilizadas pipetas e pontas de pipeta livres de DNase para evitar qualquer risco de contaminação, assegurando a precisão dos resultados obtidos. A confirmação da espécie foi realizada através do sequenciamento e BLAST do fragmento amplificado.

Foram encaminhadas para o sequenciamento as amostras que apresentaram dois critérios principais: primeiramente, as amostras deveriam ter o tamanho fragmento de DNA esperado, o que indica a eficácia dos processos de amplificação ou extração realizados; em segundo lugar, era essencial que apresentassem uma concentração adequada de material genético, assegurando a viabilidade do sequenciamento. O sequenciamento foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram purificados com o reagente *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup* (Applied Biosystems) e quantificados no equipamento *Nanodrop 2000 c* (Thermo Scientific). Após foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de primer específico e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL.

Figura 3 – Fluxograma do processo de extração de DNA e diagnóstico molecular. Amostras de cérebro, cerebelo, medula e meninges são processadas para detectar Raiva, OvHV-2, *Babesia sp.*, BoHV-1 e BoHV-5 por PCR convencional e em tempo real.



5 RESULTADOS

5.1 IMPRINT CEREBRAL E REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

Das 118 amostras analisadas (Gráfico 1), foram feitas *imprints cerebrais* para pesquisa de hemoparasitas em 5 amostras foram positivas (4,24%), 54 amostras negativas (45,76%), 6 amostras foram consideradas impróprias (5,08%) e 53 amostras não realizadas (44,92%). Entre as positivas, foram encontradas *Anaplasma marginale* em 3 amostras, *Babesia bigemina* em 1 amostra e *Babesia bovis* em 1 amostra (Tabela 1).

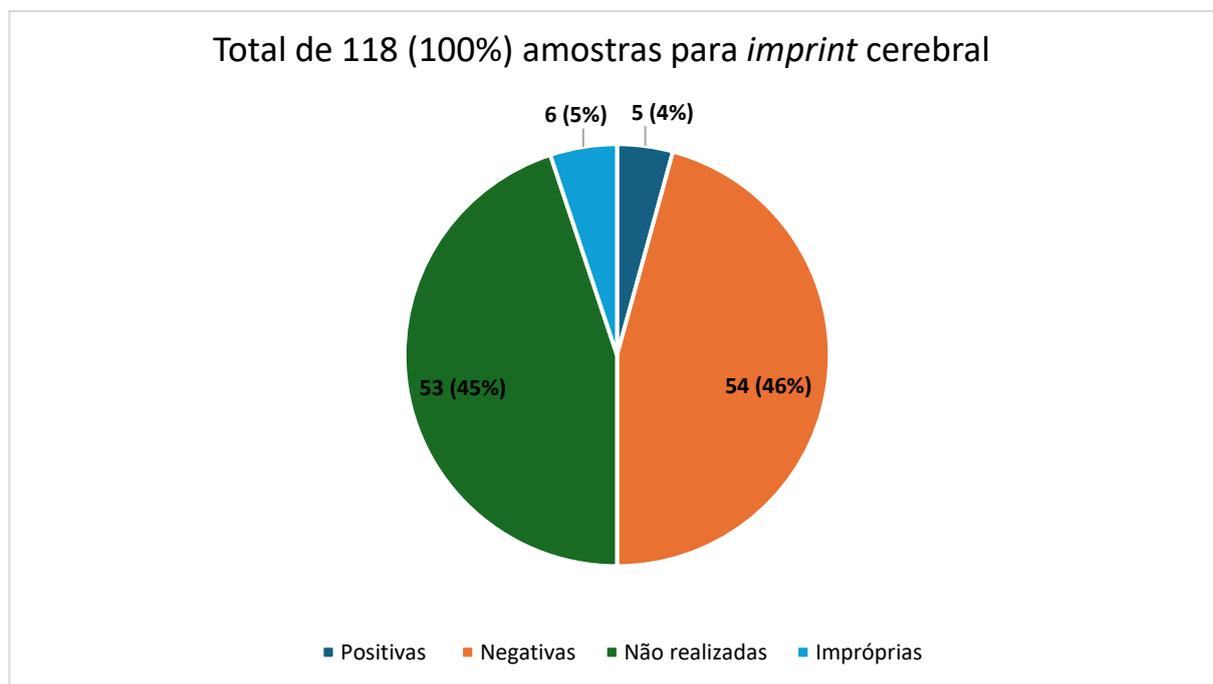
Tabela 1 — Comparativos dos resultados das técnicas de análise molecular (PCR) de encéfalo e o diagnóstico direto dos positivos para esta técnica (*imprint cerebral*).

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	RESULTADO IMPRINT CEREBRAL
Bovino nº 2603	<i>Babesia bovis</i>
Bovino nº 2678	<i>Babesia bigemina</i>
Bovino nº 2021	<i>Anaplasma marginale</i> *
Bovino nº 2171	<i>Anaplasma marginale</i> *
Bovino nº 2172	<i>Anaplasma marginale</i> *

Fonte: A autora (2024).

*Souza, A. P., et al. (2008) relataram a detecção de *Anaplasma marginale* em bovinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, por PCR, destacando a prevalência da bactéria mesmo em níveis baixos de parasitemia e a ausência de sintomas neurológicos, corroborando os achados ocasionais em exames de *imprint cerebral*.

Gráfico 1 — Distribuição das 118 amostras submetidas ao *imprint cerebral*, destacando os resultados positivos (5%), negativos (46%), não realizados (45%) e impróprios (4%) para análise.



Fonte: A autora (2024).

Na comparação entre os métodos de PCR no encéfalo e na meninge, *Babesia bovis* foi detectada em ambos os tecidos, enquanto *Babesia bigemina* foi encontrada apenas no encéfalo. Ao comparar os 5 resultados positivos dos *imprints cerebrais* (4,24%) com os 34 resultados positivos de PCR em encéfalos e meninges (28,81%) para a família Babesiidae, observou-se uma diferença significativa (Tabela 2).

Tabela 2 — Comparação entre os métodos de PCR no encéfalo e na meninge e método de *imprint cerebral*.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	RESULTADO <i>IMPRINT CEREBRAL</i>
Bovino nº 2603	<i>Babesia bovis</i>
Bovino nº 2678	<i>Babesia bigemina</i>
Bovino nº 2021	<i>Anaplasma marginale</i> *
Bovino nº 2171	<i>Anaplasma marginale</i> *
Bovino nº 2172	<i>Anaplasma marginale</i> *

Fonte: A autora (2024).

*Souza, A. P., et al. (2008) relataram a detecção de *Anaplasma marginale* em bovinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, por PCR, destacando a prevalência da bactéria mesmo em níveis baixos de parasitemia e a ausência de sintomas neurológicos, corroborando os achados ocasionais em exames de *imprint cerebral*.

5.2 REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE (PCR) DOS AGENTES VIRAIS E PARASITÁRIOS

Entre as 118 amostras testadas, 97 (82,20%) foram amostras positivas para pelo menos um dos agentes estudados, 51 (43,22%) foram positivas somente para raiva, 34 (28,81%) foram positivas somente para família Babesiidae, oito (6,78%) positivas somente para OvHV-2, três (2,54%) positivas apenas para BoAHV-1 e uma (0,85%) positiva para BoAHV-5 (Tabela 3).

Tabela 3 — Representação dos resultados dos patógenos testados juntamente com o número de amostras positivas e o percentual correspondente do total de amostras positivas.

PATÓGENOS	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS	FREQUÊNCIA
Raiva	51	43,22%
Família Babesiidae	34 (28 amostras para <i>Babesia bovis</i> e 6 amostras para <i>Babesia bigemina</i>)	28,81% (23,72% de amostras para <i>Babesia bovis</i> e 5,09% de amostras para <i>Babesia bigemina</i>)
OvHV-2	8	6,78%
BoAHV-1	3	2,54%
BoAHV-5	1	0,85%

Fonte: A autora (2024).

Nas análises das sequências obtidas por PCR para *Babesia spp.*, foram identificadas 28 (23,72%) amostras positivas para *Babesia bovis*. Destas, 18 amostras eram positivas nos encéfalos e 5 amostras positivas em meninges e 5 amostras positivas tanto para encéfalo quanto para meninge. A análise inicial das sequências parciais de nucleotídeos, realizada por meio da ferramenta BLAST revelou similaridade dessas sequências com as de *Babesia bovis* depositadas no GenBank que variou entre 95,98% e 100%. Além disso, 6 amostras foram positivas para *Babesia bigemina* somente no encéfalo, apresentando uma variação de similaridade entre 96,52% e 100% em comparação com as sequências depositadas no GenBank. É importante destacar que todas as seis amostras positivas para *Babesia bigemina* também foram positivas para o vírus da raiva.

Entre as 118 amostras testadas para OvHV-2, oito (6,78%) apresentaram resultados positivos quando analisadas por nested PCR, todas elas provenientes de tecido encefálico. A análise inicial das sequências parciais de nucleotídeos, realizada por meio da ferramenta BLAST, revelou uma similaridade entre 97,22% e 97,58% com outras sequências de OvHV-2 previamente depositadas no banco de dados GenBank.

Dentre as 118 amostras analisadas, para a presença de BoAHV-1 e BoAHV-5 por meio da técnica de PCR em tempo real, foram identificadas três (2,54%) amostras positivas para BoAHV-1 e uma (0,85%) amostra positiva para BoAHV-5. Todas as amostras positivas foram provenientes de tecido encefálico.

5.3 COINFECÇÕES

Importante destacar que das 118 amostras, 97 (82,20%) amostras foram positivas para algum agente infeccioso estudado. Destes casos positivos, 18 amostras (18,56%) apresentaram coinfeccções. Estas coinfeccções sugerem que a presença de múltiplos agentes infecciosos podendo resultar em sinais clínicos sobrepostos, complicando significativamente o diagnóstico diferencial.

Com relação as coinfeccções por *Babesia bovis* e raiva bovina oito animais foram positivas para estes agentes, a maioria das infecções de *Babesia bovis* foi detectada no encéfalo (cinco amostras), com menos casos na meninge (duas amostras) e apenas uma amostra mostrando a presença do patógeno em ambos os tecidos.

As amostras de coinfeccção positivas para *Babesia bovis* e FCM, foram encontradas em três animais, dentre eles, a infecção para *Babesia bovis* foi encontrada em uma amostra para encéfalo, uma amostra para meninge e uma amostra tanto para o encéfalo quanto para a meninge. As amostras positivas nesta coinfeccção para FCM foram encontradas todas no encéfalo nestes três animais.

A amostra de coinfeccção positivas para *Babesia bovis*, FCM e *Imprint cerebral* para *Anaplasma marginale*, foi detectado em um animal somente, uma amostra de meninge para *Babesia bovis*, positiva no *imprint cerebral* para *Anaplasma marginale* e encéfalo positivo para FCM.

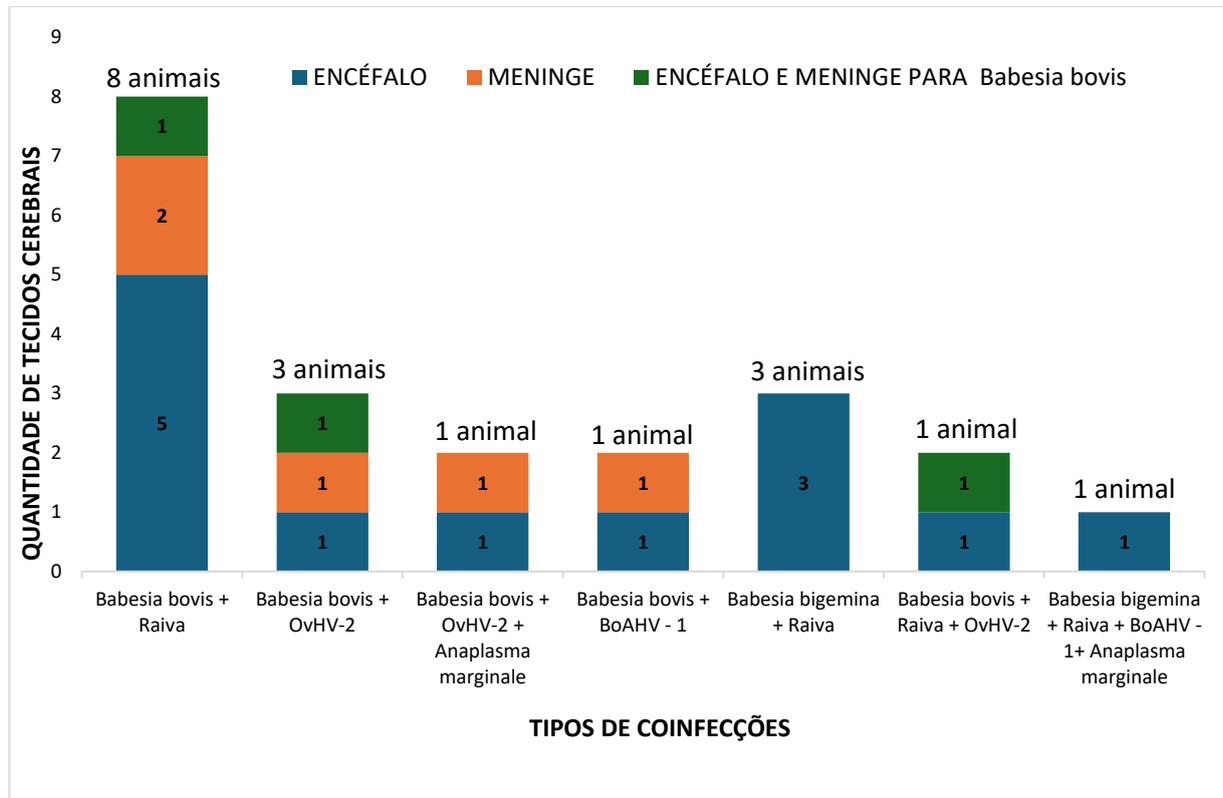
Com relação a amostra de coinfeccção positivas para *Babesia bovis* e BoAHV-1, foi detectado em um animal somente, no qual resultou na presença de *Babesia bovis* em uma amostra de meninge e a presença de BoAHV-1 em uma amostra de encéfalo.

As amostras positivas para coinfeccção para *Babesia bigemina* e raiva, foram detectadas em 3 animais, os resultados demonstraram a presença de *Babesia bigemina* em 3 amostras de encéfalos destes animais, conjuntamente com a presença de raiva bovina.

A amostra positiva para coinfeção com *Babesia bovis*, raiva e FCM em um animal, os resultados indicam a presença simultânea de raiva, uma amostra de encéfalo e meninge para *Babesia bovis* e FCM em uma amostra de encéfalo.

Por fim, a amostra positiva para coinfeção para *Babesia bigemina*, raiva, BoAHV-5 e Imprint para *Anaplasma marginale* em um animal, uma amostra de encéfalo para *Babesia bigemina*, uma amostra de encéfalo para BoAHV-5 e *Anaplasma marginale* pelo método de *imprint cerebral*.

Gráfico 2 — Representação gráfica mostrando a quantidade de tecidos cerebrais analisados para diferentes tipos de coinfeções.



Fonte: A autora (2024).

6 DISCUSSÃO

Das 118 amostras analisadas, 51 (43,22%) foram positivas somente para raiva, corroborando a literatura que aponta a raiva como a doença neurológica mais comum em bovinos no RS. Pesquisas sobre doenças neurológicas em animais no Brasil apontam consistentemente a raiva como a principal patologia (CARVALHO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2015). Embora a raiva seja frequentemente identificada como a principal doença neurológica, é importante considerar outros agentes etiológicos. Vírus como os alfa herpesvírus bovino tipo-1 e tipo-5 e o vírus da FCM são neurotrópicos e podem estabelecer infecções latentes, sendo fundamental investigar possíveis interações com a raiva (FERREIRA et al., 2009; LIMA et al., 2018).

Em relação ao *imprint cerebral*, das 118 amostras analisadas, foram feitos *imprints cerebrais* para pesquisa de hemoparasitas em cinco amostras foram positivas (4,24%), dentre elas o agente que mais foi encontrado neste método foi *Anaplasma marginale* (3 lâminas), seguido de *Babesia bovis* (1 lâmina) e *Babesia bigemina* (1 lâmina). Seguidos de 54 amostras negativas (45,76%), seis amostras foram consideradas impróprias (5,08%) e 53 amostras não realizadas (44,92 %). A técnica de *imprint cerebral* resultou em uma baixa quantidade de resultados positivos, quando encontrados, a quantidade de lâminas positivas para *Anaplasma marginale* foi a mais encontrada, isso pode ocorrer devido à alta parasitemia descrita na anaplasmose podendo atingir 50% dos eritrócitos na fase aguda (JAMESON et al., 2007). Quanto à infecção por *Babesia bigemina*, as manifestações clínicas geralmente apresentam-se quando a parasitemia excede a 1%. Nos casos de *Babesia bovis*, a parasitemia é mais baixa variando em torno de 0,04% a 0,2% o que dificulta o diagnóstico direto (MAHONEY et al., 1973). É importante se considerar mais eficaz para a detecção de *Babesia bovis* durante a fase clínica da doença devido à concentração elevada de parasitas no tecido cerebral afetado ou em casos post mortem. Em estágios crônicos, subclínicos ou com níveis muito baixos de parasitas, a técnica pode não ser capaz de detectar a presença da infecção. Para aumentar a sensibilidade diagnóstica, métodos moleculares como a PCR podem ser utilizados como complementares (UILENBERG, 2006). A presença de parasitas no esfregaço confirma a infecção por *Babesia* sp., entretanto, a ausência de parasitas não descarta a doença, especialmente em casos de baixa parasitemia (MEHLHORN & SCHEIN, 1984).

Quanto as amostras não realizadas ou impróprias, não foram feitas pois essa técnica de *imprint cerebral* tem limitações, como por exemplo, encéfalos que chegam para análise congelados ou que foram congelados durante o transporte. O congelamento pode causar danos significativos ao tecido cerebral, resultando na formação de artefatos que dificultam a interpretação microscópica. O processo de congelamento e subsequente descongelamento promove a formação de cristais de gelo, que podem danificar tanto as células quanto a estrutura tecidual, comprometendo a precisão

da técnica de imprint. Além disso, as estruturas intracelulares, incluindo parasitas como a *Babesia* sp., podem não ser preservadas adequadamente em cérebros congelados, o que dificulta a identificação e o estudo detalhado do parasita nas células cerebrais. A qualidade da coloração também é prejudicada, uma vez que a eficácia das técnicas de coloração utilizadas para identificar a *Babesia* sp. pode ser comprometida em tecidos danificados pelo congelamento. Certos corantes podem não penetrar ou se fixar de maneira eficaz, complicando ainda mais a identificação precisa do parasita (SILVEIRA et al., 2015; BROWN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2021). É significativo ressaltar que nestes casos, a possibilidade do diagnóstico molecular por PCR possuir capacidade de detectar agentes infecciosos sem necessidade de encontrar microrganismos viáveis na amostra biológica (HAAS, 2016), podendo ser utilizada quando as amostras não possuem viabilidade para o diagnóstico direto, como quando são enviadas congeladas ou em princípio de decomposição (SMITH et al., 2018).

Importante destacar que houve mais animais positivos para *Babesia bovis* do que para *Babesia bigemina* neste estudo no método de PCR, pois as infecções causadas por *Babesia bovis*, há um fenômeno conhecido como sequestro de eritrócitos parasitados nos capilares cerebrais, devido à predileção desse parasita por vasos sanguíneos pequenos. Trindade; Almeida e Freitas (2011, p. 10) complementam que, para uma melhor realização do exame, deve-se preparar a lâmina a partir de sangue coletado dos capilares periféricos, como da região marginal da orelha ou ponta da cauda no caso de *Babesia bovis*, pois a circulação sanguínea geral possui 20 vezes menos desse parasito do que no sangue periférico para *Babesia bigemina* pode-se utilizar até mesmo, sangue coagulado por haver uma quantidade maior desse protozoário no sangue circulante.

Tem sido observado que, na infecção por *Babesia bovis* em bovinos, ocorre sequestro de eritrócitos parasitados nos capilares da substância cinzenta do encéfalo (ZLOTNIC, 1953; CALLOW & McGAVIN, 1963; ROGERS, 1971; PATARROYO et al., 1982). Isso provoca eventos químicos e imunológicos que induzem uma manifestação clínica distinta, caracterizada por sinais neurológicos e conhecida como babesiose cerebral (CALLOW & McGAVIN, 1963; KESSLER et al., 1983). *Babesia bovis* é encontrado em capilares de órgãos centrais como

cérebro, cerebelo, meninge (MASSARD; FREIRE, 1985). Neste estudo, das 34 (28,81%) amostras positivas para a família Babesiidae encaminhadas para sequenciamento, 28 (23,72%) foram positivas para *Babesia bovis* e seis (5,09%) para *Babesia bigemina*. Os resultados positivos das seis amostras para *Babesia bigemina* foi obtido através das amostras de encéfalos, das 28 amostras de resultados positivas para *Babesia bovis*, 18 amostras eram positivas nos encéfalos e 5 amostras positivas em meninges e 5 amostras positivas tanto para encéfalo quanto para meninge

Em relação a FCM as 8 (6,78%) amostras positivas foram detectadas em encéfalos, pois apresenta uma clara predileção pelo encéfalo em comparação às meninges. Preferência que é

evidenciada pela capacidade do vírus de infectar e replicar-se de maneira mais eficiente nas células neurais, resultando em danos significativos ao Sistema Nervoso Central dos animais afetados (MACLACHLAN et al., 2009; BARRETT et al., 2006). Esta característica patológica contribui para os sintomas neurológicos graves associados à doença, como convulsões e outras manifestações neurológicas severas. Foi utilizado o método de Nested PCR para detecção deste agente, pois os métodos moleculares permitem o diagnóstico post-mortem em órgãos e fluidos, são altamente sensíveis e específicos e permitem o diagnóstico de FCM na ausência de sinais clínicos (latência), como pode existir em doenças crônicas e em animais recuperados (HEADLEY et al., 2012; TRAU et al., 2007).

Importante destacar que foi realizada uma pesquisa sobre as propriedades que apresentaram casos positivos para FCM. Encontrou-se que duas propriedades mantinham bovinos em regime de subsistência, enquanto outras duas haviam adquirido bovinos de terceiros, mas sem informações disponíveis sobre a quantidade de animais nessas propriedades. Em uma das propriedades, havia a criação de 135 ovinos e 232 bovinos, e outra mantinha 20 ovinos e 178 bovinos, onde dois animais foram confirmados como positivos para o vírus OvHV-2. Além disso, houve uma propriedade sem registro na inspetoria, o que impossibilitou a obtenção de informações sobre a quantidade de animais criados. Para complementar, GARMATZ et al. (2012) relataram em seus estudos que dois surtos de FCM em bovinos no Rio Grande do Sul, foi confirmada a transmissão da doença pelo contato direto entre bovinos e ovinos, especialmente durante o período de parição dos ovinos.

Amostras positivas para BoAHV-1 (3 amostras) e BoAHV-5 (1 amostra) foram encontradas em encéfalos, pois estes agentes têm uma afinidade específica pelas células do Sistema Nervoso Central. Isso significa que esses vírus têm maior capacidade de infectar neurônios e outras células do cérebro em comparação com as células das meninges (SARMIENTO-SILVA, R. E., CISNEROS, A., TRUJILLO-ORTEGA, M. E., 2008). Uma vez no SNC, a replicação viral ocorre mais eficientemente no tecido cerebral, causando danos significativos, como necrose neuronal e inflamação cerebral (VOGEL, F. S. F., WEIBLEN, R., FLORES, E. F., 2007).

O BoAHV-5 circula no rebanho bovino do RS e é o mais frequente em relação ao BoAHV-1 (HOLZ et al., 2009; RODENBUSCH et al., 2020). No presente estudo houve mais positivos para BoAHV-1 do que para BoAHV-5. Investigar esses fatores que influenciaram esses resultados e compreender seu impacto na epidemiologia desses agentes é essencial para orientar políticas de saúde animal e estratégias de controle efetivas (JONES et al., 2019; SMITH et al., 2018; RODENBUSCH et al., 2020).

Das 118 amostras, 97 amostras (82,20%) foram positivas para algum agente estudado, 18 amostras (18,56%) apresentaram coinfeções, o que indica que as coinfeções podem apresentar sinais clínicos sobrepostos, dificultando o diagnóstico diferencial. A presença simultânea de

múltiplos patógenos pode exacerbar a severidade da doença, levando a uma maior taxa de mortalidade e morbidade (BOCK et al., 2004). Entender a interação entre diferentes patógenos pode ajudar a desenvolver tratamentos combinados mais eficazes (VOGEL et al., 2003). Sendo assim, as coinfeções podem resultar em perdas econômicas maiores devido ao aumento da mortalidade, redução na produção e maiores custos veterinários (BOCK et al., 2004). Para complementar, foram 21 amostras (17,80%) negativas em relação a agentes investigados. Esta constatação evidencia a necessidade premente de uma investigação etiológica mais abrangente e meticulosa in loco, visando elucidar a causa mortis dos animais. Faz-se imperativo a implementação de um protocolo de diagnóstico diferencial mais amplo, que não se restrinja apenas às causas infecciosas, mas que também contemple fatores bacterianos, nutricionais e toxicológicos (ACHAR BACTERIOLÓGICO). (BOCK et al., 2004; PLOWRIGHT & MACADAM, 1965; VOGEL et al., 2003). Esta abordagem multifatorial e interdisciplinar é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle mais eficazes, contribuindo assim para a melhoria da saúde e do bem-estar animal no contexto da produção pecuária.

Este estudo tem implicações significativas para a saúde animal e o manejo de doenças neurológicas em bovinos, especialmente no contexto do Rio Grande do Sul. A alta prevalência de raiva (43,22% das amostras) reforça a necessidade de programas de vacinação mais abrangentes e eficazes, considerando o caráter fatal e zoonótico desta doença. A identificação de coinfeções, envolvendo agentes como *Babesia bovis*, OvHV-2 e alfaherpesvírus bovinos, destaca a complexidade do diagnóstico diferencial e a importância de métodos diagnósticos mais precisos, como o PCR, que se mostrou mais eficaz que o *imprint cerebral* na detecção de *Babesia spp.* A análise de diferentes tecidos (encéfalo e meninge) revelou-se crucial para uma compreensão mais completa da distribuição dos agentes infecciosos, particularmente na babesiose cerebral. Estes achados corroboram com estudos anteriores, como o de Rodrigues et al. (2018), que enfatizam a importância de uma abordagem multifacetada no diagnóstico e controle de doenças neurológicas em bovinos. Tais resultados sugerem a necessidade de uma abordagem mais abrangente no diagnóstico e manejo dessas doenças, incluindo a implementação de protocolos de diagnóstico que considerem múltiplos agentes, a capacitação de veterinários e produtores rurais para identificação precoce de sinais clínicos, e o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes, como programas de vigilância e controle de vetores. Essas medidas são essenciais para mitigar o impacto econômico dessas doenças na pecuária do Rio Grande do Sul, melhorando a saúde e o bem-estar dos bovinos e, conseqüentemente, a produtividade do setor.

7 CONCLUSÃO

- No presente estudo, foi possível detectar 5 amostras positivas para TPB por meio do *imprint cerebral*, enquanto 54 amostras foram negativas, 6 foram consideradas impróprias e 53 amostras não foram submetidas ao *imprint*. Entre as amostras positivas, *Anaplasma marginale* foi identificado em 3 amostras, *Babesia bigemina* em 1 amostra e *Babesia bovis* em 1 amostra.
- Quando utilizada a PCR e sequenciamento genômico, foi possível detectar 34 amostras positivas para os agentes da TPB, sendo 28 amostras positivas exclusivamente para *Babesia bovis*. Destas, 18 amostras eram positivas nos encéfalos e 5 amostras positivas em meninges e 5 amostras positivas tanto para encéfalo quanto para meninge. Apenas seis amostras de encéfalos testaram positivo para *Babesia bigemina*.
- Entre as amostras testadas para a presença de DNA do vírus da febre catarral maligna (OvHV-2), oito amostras apresentaram resultados positivos e foram identificadas três amostras positivas para BoAHV-1 e uma amostra positiva para BoAHV-5.
- Nas amostras positivas, os vírus BoHV-1 e BoHV-5 e OvHV-2 foram detectados em encéfalo, mas não nas meninges.
- Foram detectadas várias coinfeções nos animais analisados. Observou-se coinfeção de *Babesia bovis* e raiva bovina em oito animais. *Babesia bovis* também foi encontrada em coinfeção com FCM em três animais. Em um animal, foram identificados *Babesia bovis*, FCM e *Anaplasma marginale*. A coinfeção de *Babesia bovis* e BoAHV-1 foi identificada em um animal. Coinfeções de *Babesia bigemina* e raiva bovina foram encontradas em três animais. Além disso, um animal revelou coinfeção com *Babesia bovis*, raiva bovina e FCM, enquanto outro apresentou *Babesia bigemina*, raiva bovina, BoAHV-5 e *Anaplasma marginale*. Por fim, *Babesia bovis* foi identificada tanto no encéfalo quanto na meninge. No entanto, BoAHV-1, BoAHV-5 e FCM foram mais frequentemente encontrados no encéfalo.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pró e contra a erradicação do IBR. **Microbiologia Veterinária**, v. 113, p. 93–94.
- AJLONG, J. R. et al. Alfaherpesvírus bovino tipo 1: patógeno viral emergente no Brasil. **Microbiologia Veterinária**, v. 212, p. 7-15, 2017.
- ALBERTINI, A. A.; BAI, C. F.; FASSI-FRANCK, M. M. "Characterization of the rabies virus G protein and its role in pathogenesis." **Journal of Virology**, v. 85, n. 15, p. 7126-7134, 2011.
- ALBERTINI, A.A.V.; RUIGROK, R.W.H.; BOLDEL, D. Transcrição e replicação do vírus da raiva. **Avanços na Pesquisa de Vírus**, v. 79, p. 1–22, 2011.
- ARRUDA, D. G. et al. Diferenciação clínica e diagnóstico diferencial entre as formas neurológicas de encefalite provocadas por BoAHV-1 e BoAHV-5. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1258-1265, 2010.
- BANERJEE, A. K. "The molecular biology of the rabies virus." **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 68-88, 1987.
- BANERJEE, A.K. Transcrição e replicação de rabdovírus. **Revisões Microbiológicas**, v. 51, n. 1, p. 66-87, 1987.
- BARBOSA, D. R.; SOARES, C. O. Diagnóstico molecular de *Babesia bovis* em bovinos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 168-175, 2020.
- BARRET, T.; PASTORET, P. P. **Peste bovina e peste dos pequenos ruminantes: pragas virais de grandes e pequenos ruminantes**. Nova York: Imprensa Acadêmica, 2009.
- BOCK, R. E.; KESSLER, R. H.; JUNG, K. L.; DUNN, A. M.; NUNES, C. P. et al. "The transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in tropical and subtropical regions." **Parasitology**, v. 129, n. 6, p. 601-615, 2004.
- BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. S247-S269, 2004.
- BULING, A. D.; WATT, M. D.; CONNOLLY, D. C.; MURRAY, P. "Detection of *Babesia bovis* in cattle using a polymerase chain reaction assay." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1874-1880, 2007.
- CIBULSKI, S. P. et al. A plate of viruses: viral metagenomics of supermarket chicken, pork and beef from Brazil. **Virology**, v. 552, p. 10-19, 2021.
- DIALLO, I. S. et al. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, p. 93–94, 2010.

DALL'AGNOL, M.; MENDES, L. A.; CARRERA, J. S.; RANGEL, A. H. "Epidemiology of bovine babesiosis in southern Brazil: An overview of the clinical and economic impacts." **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 14-22, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Estrutura de taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos de *Toxoplasma gondii* e biologia e desenvolvimento de cistos teciduais. **Revisões de Microbiologia Clínica**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 2003.

DUMLER, J. S. et al. Reorganização de gêneros nas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae na ordem *Rickettsiales*: unificação de algumas espécies de *Ehrlichia* com *Anaplasma*, *Cowdria* com *Ehrlichia* e *Ehrlichia* com *Neorickettsia*, descrições de seis novas combinações de espécies e designação de *Ehrlichia equi* e 'agente HGE' como sinônimos subjetivos de *Ehrlichia phagocytophila*. **Revista Internacional de Microbiologia Sistemática e Evolutiva**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por alfaherpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 123-131, 2004.

FACCINI, S. et al. Development and evaluation of a new Real-Time RT-PCR assay for detection of proposed influenza D virus. **Journal of Virological Methods**, v. 243, p. 31-34, 2017.

FARIAS, N.A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. (Eds). **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3ª ed. Santa Maria: Pallotti, p. 524-532, 2007.

FAVI, M. R.; YUNG, V. S. "Ecology of rabies virus and its transmission in bats in Latin America." **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 43, p. e3, 2018.

FAVI, M.; YUNG, V. Raiva bovina: diagnóstico clínico e desafios em áreas endêmicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, n. 3, p. 213-220, 2018.

FERREIRA, R. L. et al. Histopathological findings in bovine rabies: correlation with clinical stages. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 4, p. 477-483, 2008.

FIGHERA, R.A. **Anemia em Medicina Veterinária**. Santa Maria: Pallotti, 214 p., 2001.

FIGHERA, R.A.; GRAÇA, D.L. Sistema hematopoiético. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. (Eds). **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, p. 311-406, 2010.

FIGUEIREDO, L.J.C.; CASTELO BRANCO, M.B.; OLIVEIRA, A.C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da FCM. In: **Anais do XVI Congresso Mundial de Buiatria, Salvador, BA**. p. 666-671, 1990.

FURLAN, F.H. et al. Febre catarral maligna em bovinos no norte de Mato Grosso. **Acta Scient. Vet.**, v. 40, p. 1043, 2012.

- GOMES, L.I. et al. Detecção de alfa herpesvírus bovino 5 (BoAHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 217-220, 2002.
- GOMES, M.J.P. **Gênero *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae)**. Porto Alegre: FAVET-UFRGS, 2013.
- GONÇALVES, R.C. et al. Tristeza parasitária em bovinos na região de Botucatu - SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 307-312, 2011.
- GONÇALVES, R. R.; ALVAREZ, I. M.; LOPES, A. L. "Surto de raiva em bovinos no Rio Grande do Sul: análise epidemiológica e controle." **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, p. 1-8, 2020.
- GRAU, H.E.G. et al. Transmissão transplacentária de *Anaplasma marginale* em bovinos de corte cronicamente infectados no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 189-193, 2013.
- HANSON, R.P. A história natural da raiva. Nova York: Imprensa Acadêmica, 1975.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). "The ICTV Report on Virus Taxonomy." **Elsevier Academic Press**, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2023. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 set. 2023.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. Genus: Lyssavirus. ICTV Taxonomy Release, 2008. Disponível em: <https://ictv.global>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- ISENI, M. E.; GAO, G.; FUREY, W.; BASTOS, A. D. "Molecular virology and pathogenesis of rabies virus." **Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 519-530, 1998.
- JACKSON, A.C. **Raiva: base científica da doença e seu manejo**. 3. ed. San Diego: Imprensa Acadêmica, 2013.
- KELLING, C.L. Evolução das vacinas contra o vírus da diarreia viral bovina. **Clínicas Veterinárias da América do Norte: Prática de Animais de Alimentação**, v. 20, n. 1, p. 115-129, 2004.
- KESSLER, R. H.; LOPES, R. E.; RANGEL, A. H.; DUNN, A. M.; NUNES, C. P. et al. "Impacto das condições climáticas e de manejo na transmissão de *Babesia bovis* no Rio Grande do Sul." **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 43-49, 2015.
- KESSLER, R. H.; MENDONÇA, C. L.; LEITE, R. C. **Doenças parasitárias dos bovinos: uma abordagem regional**. Belo Horizonte: Rabelo, 1998. 360 p.
- KESSLER, R. H.; RANGEL, A. H.; LOPES, R. E.; NUNES, C. P. "Clima e epidemiologia da babesiose bovina no sul do Brasil." **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 2, p. 127-133, 1998.

- KOCAN, K.M. et al. Antígenos e alternativas para o controle da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos. **Revisões de Microbiologia Clínica**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.
- LEUNG, A. K.; YUNG, M. F.; COLEMAN, D. A. "Rabies virus: a model for virus-cell interaction." **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, n. 1, p. 25-33, 2007.
- LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N. Fatores associados à mastite subclínica bovina na região sudeste do Brasil. **Pesquisa em Ciências Veterinárias**, v. 73, n. 1, p. 99-103, 2002.
- LOPES, R. E.; KESSLER, R. H.; RANGEL, A. H. "Babesiose cerebral e a influência do clima subtropical no Rio Grande do Sul." **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 18, n. 2, p. 110-115, 2021.
- MACHADO, R.Z. et al. Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para a detecção de anticorpos contra *Babesia bovis* em bovinos. **Parasitologia Veterinária**, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.
- MARQUES, L.C. et al. Infecção experimental de coelhos com *Anaplasma marginale*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 56-61, 2000.
- MARTINS, L. S.; CORRÊA, L. M. "Aspectos epidemiológicos e clínicos da babesiose bovina no Brasil." **Arquivos de Ciências Veterinárias**, v. 35, p. 245-250, 1995.
- MARTINS, D. R.; CORRÊA, P. M. Efeitos patológicos da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 34-39, 1995.
- MASSARD, C. L.; PEREIRA, M. H.; OLIVEIRA, R. P. Disfunções hepáticas em bovinos com anaplasmoses. **Veterinary Parasitology**, v. 81, n. 2-3, p. 151-158, 1998.
- MEGID, J. et al. Bovine malignant catarrhal fever: a review of the virus, its transmission and epidemiology. **Veterinary Journal**, v. 205, n. 3, p. 276-282, 2015.
- MENDONÇA, C.L. et al. Febre catarral maligna em bovinos no Estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1201-1204, 2008.
- MESLIN, F. X.; BRIGGS, D. **Manual de diagnóstico e controle da raiva**. Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), 2013.
- MESLIN, F. X.; BRIGGS, D. "The evolution of rabies control: A global perspective." **In: Rabies Control: The Role of the World Health Organization**. WHO Press, 2013.
- MEYER, E. M. et al. Detection of Bovine Herpesvirus-5 (BoHV-5) DNA in the central nervous system of cattle. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1871-1876, 2001. DOI: 10.1099/0022-1317-82-8-1871.
- MEYER, M. Método de inoculação intracerebral para diagnóstico da raiva e avaliação de vacinas. **Jornal de Ciências Veterinárias**, v. 42, n. 4, p. 121-128, 2001.
- MESLIN, F. X.; BRIGGS, D. **Manual de diagnóstico e controle da raiva**. Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), 2013.

- MONTEIRO, A. C. Infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos: diagnóstico e manejo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 185-192, 2010.
- MONTEIRO, S. G. "Babesiose bovina: diagnóstico e controle no Rio Grande do Sul." **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 300-305, 2010.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 494 p., 2005.
- NORVAL, R. A.; LEWIS, L. A.; ADAMS, R. P. "Ecology of *Anaplasma marginale* and the factors influencing its transmission." **Veterinary Parasitology**, v. 45, p. 75-82, 1992.
- NORVAL, R. A. I.; ROSS, L. J.; KIRK, R. S. Ecological studies on the transmission of *Anaplasma marginale* in southern Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 42, n. 4, p. 265-278, 1992.
- OLIVEIRA, C.M. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos no município de Patos, Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 156-160, 1992.
- PAIVA, F.; PERRI, S.H.V. *Trypanosoma* spp. em caprinos: prevalência e possíveis vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 19-25, 1999.
- PAULA, V.S.O. et al. Identificação molecular de helmintos de importância zoonótica em amostras de água de esgoto na cidade do Rio de Janeiro. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, p. 4965-4971, 2014.
- PEREZ, J. et al. Detection of Bovine Herpesvirus-5 in various regions of the central nervous system of infected cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 133-140, 2002. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00099-9.
- PLOWRIGHT, W.; MACADAM, R.; ARMSTRONG, J. Growth and characterization of the virus of bovine malignant catarrhal fever in East Africa. **Journal of General Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 253-266, 1965.
- PLOWRIGHT, W. Malignant catarrhal fever virus. In: DINTER, Z.; MOREIN, B. (Eds.). **Virus Infections of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p.123-150.
- RIET-CORREA, F. et al. (Eds.). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 640 p., 2007.
- RISTIC, M.; LEVY, R. F. "Babesiosis: Diagnosis and Clinical Management." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 555-561, 1981.
- ROEHE, P. M. **Estudo epidemiológico da febre catarral maligna em bovinos no Brasil**. 1981. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1981.
- RODRIGUES, M. F.; MENDONÇA, C. L.; SOUZA, J. C. O.; KESSLER, R. H. Aspectos clínicos da anaplasmoze bovina: infecção por *Anaplasma marginale*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 1067-1074, 2005.

- RODRIGUES, R. L.; ALMEIDA, M. M.; LOPES, E. R.; SILVA, P. M.; GONÇALVES, D. P. "As manifestações clínicas da anaplasmoze bovina e fatores de risco na região sul do Brasil." **Pesquisas Veterinárias Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 27-32, 2005.
- RODRIGUEZ, L. L.; VILLA, J. F.; LEE, D. "Rabies Virus: Diagnostics, Vaccines, and Epidemiology." **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 927-935, 2007.
- RUPPRECHT, C. E. et al. Immunofluorescence assay for the detection of rabies virus antigen in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1235-1243, 2018a.
- RUPPRECHT, C. E. et al. *Biological assay for rabies virus: a review of the test and its significance in post-exposure treatment.* **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 7, p. 981-987, 2018b.
- SARMIENTO-SILVA, R. E.; CISNEROS, A.; TRUJILLO-ORTEGA, M. E. Enfermedades neurológicas en bovinos: revisión de la literatura y su diagnóstico en México. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 29, n. 3, p. 257-271, 2008.
- SCHNEIDER, M. et al. Raiva em bovinos: diagnóstico e características clínicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 218-225, 2009.
- SERRANO, M. E. Identificação molecular de hematozoários de importância veterinária em amostras clínicas no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 123-130, 2006.
- SCHNEIDER, M.C. et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 25, p. 260-269, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-5-32.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- SCHNEIDER, M.; LIMA, F. F.; PEREIRA, A. R.; SANTOS, M. "Role of *Desmodus rotundus* in the transmission of rabies in Latin America." **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 138-144, 2009.
- SILVA, A. M.; CARVALHO, M. J.; ALMEIDA, R. A. "Impacto da raiva bovina no Rio Grande do Sul: Análise de surtos e medidas preventivas." **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, p. 162-172, 2021.
- SILVA, A. M.; RANGEL, A. H.; KESSLER, R. H.; LOPES, R. E. "*Babesia bovis*: diagnóstico e epidemiologia em bovinos no Rio Grande do Sul." **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 23, n. 3, p. 300-305, 2016.
- SILVA, G. R. et al. Análise da vulnerabilidade à raiva bovina em áreas com alta concentração de morcegos hematófagos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, n. 3, p. 001-015, 2021.
- SMITH, R. M.; JONES, K. S.; TAYLOR, S. "Phylogenetic classification of rabies virus variants and their relevance to epidemiology." **Journal of Virology**, v. 94, n. 15, p. 455-463, 2020.

- SMITH, T. G. et al. Evolutionary and geographic nomenclature for Rabies virus lineages. **Journal of Virology**, v. 94, n. 18, p. e00716-20, 2020.
- SOUZA, J. A.; SILVA, G. M.; SANTOS, P. F. "Vacinação contra a raiva em bovinos: Um estudo epidemiológico nas regiões endêmicas." **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 40, n. 3, p. 236-240, 2018.
- SOUZA, R. I.; LIMA, F. A.; BARBOSA, J. A. Influência da temperatura e do pH na sobrevivência de *Anaplasma marginale* em carrapatos infectados. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 45-50, 2011.
- SOUZA, T. D.; TEIXEIRA, M. L.; FERNANDES, L. O. Patogênese do vírus herpes bovino tipo 1 (BHV-1) em infecções respiratórias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 59-67, 2006.
- SPIPKI, F. et al. Encefalite por alfa herpesvírus bovino e diagnóstico diferencial com raiva. *Revista Brasileira de Virologia*, v. 9, n. 1, p. 63-69, 2005.
- THORNTON, R.N.; REED, S. E.; THOMPSON, E.J. et al. **Doenças Infeciosas de Animais de Produção**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001.
- TONINI, J. P. et al. Epidemiologia molecular de *Babesia bovis* em bovinos no Brasil. **Parasitologia Veterinária**, v. 149, n. 1, p. 68-75.
- SPIPKI, F. R. et al. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**, v. 129, n. 2, p. 191-193, 2005.
- VOGEL, F. S. et al. Histopathology and PCR diagnosis of Bovine Herpesvirus-5 encephalitis in cattle. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 243-247, 2003. DOI: 10.1354/vp.40-3-243.
- WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. "Anaplasma marginale and other hemoprotozoan diseases in cattle." **Veterinary Medicine**, v. 42, p. 105-110, 2011.
- WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Veterinary Hematology: Atlas of Common Domestic Animals**. 3. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 361 p.
- ZHU, Z.; GUO, J. "Molecular epidemiology of rabies virus and implications for control." **Viral Research**, v. 213, p. 56-64, 2016.