

Detecção de herpesvírus bovino tipos 1 e 5, herpesvírus ovino tipo 2, *Babesia* spp. e vírus da raiva em encéfalos de bovinos com síndrome neurológica em 2018, no Rio Grande do Sul, Brasil.

Submissão: 22/08/2024

Aceito: 18/12/2024

Adriana Almeida Belaguarda¹, José Carlos Ferreira², Laura Lopes de Almeida³, Carla Rosane Rodenbusch⁴

¹ Programa de Pós-graduação em Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria da Agricultura Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação. Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brasil. CEP 92990-000. Email: abelaguarda@gmail.com, ORCID 0009-0007-2316-1383

² Laboratório de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria da Agricultura Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação. Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brasil. CEP 92990-000. Email: zecasarmenferreira@gmail.com, ORCID 0000-0002-4315-9359

³ Programa de Pós-graduação em Saúde Animal e Laboratório de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria da Agricultura Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação. Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brasil. CEP 92990-000. Email: lauravirol@gmail.com, ORCID 0000-0002-6131-9221

⁴ Programa de Pós-graduação em Saúde Animal e Laboratório de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria da Agricultura Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação. Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brasil. CEP 92990-000. Email: carlarodenbusch@yahoo.com.br, ORCID 0000-0003-0911-5966

Email para correspondência: carlarodenbusch@yahoo.com.br

Resumo: As doenças do sistema nervoso central dos bovinos constituem um grupo de enfermidades importantes, manifestando-se por distúrbios neurológicos variáveis e inespecíficos que geralmente ocorrem na forma de surtos e sendo quase sempre fatais. O objetivo deste trabalho foi pesquisar agentes virais e parasitários, como diagnóstico diferencial de raiva, em encéfalos de bovinos com síndrome neurológica, em 2018 no Rio Grande do Sul. As amostras de encéfalos bovinos foram submetidas à imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos lactentes para diagnóstico de raiva, posteriormente foram analisadas por uma PCR em tempo real para herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 (BoHV-1 e BoHV-5), uma nested PCR para herpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2), agente causador da febre catarral maligna (FCM) e uma PCR para a família Babesiidae. As amostras positivas na PCR para a família Babesiidae foram sequenciadas para a identificação do agente e as positivas para OvHV-2 para a construção da árvore filogenética. Foram analisadas 85 amostras e não foram encontradas amostras positivas para BoHV-1. Foram positivas somente para raiva, 32 amostras. Cinco amostras foram positivas somente para OvHV-2, cinco somente para *Babesia* spp, uma amostra somente para BoHV-5, três apresentaram coinfeção de raiva e OvHV-2 e uma coinfeção de raiva e *Babesia bigemina*. Foi possível a detecção de babesias tanto no encéfalo como nas meninges. A detecção dos agentes causadores de síndromes neurológicas em bovinos, por biologia molecular gera um resultado rápido e pode contribuir para o diagnóstico diferencial de raiva e outras doenças do sistema nervoso central.

Palavras-chaves: babesiose cerebral, febre catarral maligna, meningoencefalite herpética.

1. Introdução

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro contribuindo para a economia nacional. O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo com aproximadamente 238 milhões de cabeças e o Rio Grande do Sul (RS) possui cerca de 12 milhões de bovinos, o que lhe confere o 8º maior rebanho bovino do país (IBGE, 2023). A região da fronteira oeste se destaca por abrigar a maior quantidade de gado de corte do estado, onde essa atividade tem forte relevância econômica, social e cultural (Gonçalves et al, 2018).

Entre as diversas doenças que acometem bovinos no Brasil, os distúrbios do sistema nervoso central se destacam devido à sua alta frequência e taxas de mortalidade. São doenças economicamente importantes que apresentam causas virais, bacterianas, tóxicas, circulatórias, metabólicas, congênitas ou neoplásicas (Terra et al, 2018).

Dentre as doenças virais mais diagnosticadas, entre 2010 e 2017, no sistema nervoso central de bovinos em Goiás estão a raiva (29,41%), as meningoencefalites causada por herpesvírus bovinos (15,88%) e a febre catarral maligna (1,7%) (Terra et al, 2018). No Mato Grosso do Sul, entre 2008 e 2012, botulismo e raiva foram as mais identificadas (16,67% e 15,92% respectivamente), seguido de poliencefalomalácia (8,05%) e meningoencefalite por herpesvírus (4,31%). A babesiose cerebral e a febre catarral maligna foram doenças esporádicas com menos de 1% de ocorrência (Ribas et al, 2013).

Um estudo retrospectivo realizado em registros de 6.021 necropsias de bovinos realizadas num período de 36 anos (1964 a 1999) no RS, demonstrou que de 305 casos em que foi possível chegar ao diagnóstico, 49,51% foram raiva, 5,57% babesiose cerebral, 4,59% meningoencefalite necrosante por herpesvírus bovino e 3,28% por febre catarral maligna (Sanches et al, 2000).

Estudos mais recentes no RS, demonstram que a raiva ainda tem uma ocorrência bastante alta entre animais com síndromes neurológicas, com média de 58% entre 2011 e 2015, e 41,4% entre 2016 e 2019 (Rodenbusch et al, 2016; Cappelari et al, 2021).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar, por biologia molecular, agentes infecciosos causadores de síndromes neurológicas em encéfalos de bovinos a fim de determinar o diagnóstico diferencial de raiva bovina no RS.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

As amostras de encéfalos bovinos recebidas ao longo de 2018 para o diagnóstico de raiva foram utilizadas neste trabalho. Foram selecionadas 85 amostras para o estudo, uma vez que essas amostras possuíam quantidade suficiente para realização de todas as análises. Porções da medula oblonga, do cerebelo e das porções dorsolateral e posterior do córtex foram seccionadas em fragmentos de 1-2 cm, colocados em placas de Petry e mantidos refrigerados até o teste para raiva. Para a realização das provas de biologia molecular para detecção de herpesvirus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2, agente da febre catarral maligna) e *Babesia* spp., 1g de cada porção de tecido encefálico foram cortados em pequenos fragmentos, homogeneizados e congelados a -20°C (Rodenbusch et al., 2020). Nos encéfalos que possuíam meninge (pia-máter ou aracnoide), uma porção destas, contendo os vasos foi separada e congelada conforme descrito acima, para detecção de *Babesia* spp.

2.2. Técnicas e amostragem de dados

Os encéfalos submetidos ao laboratório para diagnóstico de raiva foram acompanhados por um formulário de síndrome neurológica (FORM-SN) que continham dados dos bovinos como idade, sexo, sinais clínicos e a identificação da propriedade e proprietário. O FORM-SN é um formulário pertencente ao Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e nele os sinais clínicos são classificados como (A) Alteração neurológica ou de sensibilidade (cegueira; convulsões; dismetria; fotofobia/aerofobia; espasmos musculares; hiperestesia ao som, ao toque ou à luz; midríase; movimentos de pedalagem; nistagmo; opistótono; priapismo; paralisia flácida dos membros anteriores e/ou posteriores; paralisia, mas alerta; posicionamento anormal da cabeça ou das orelhas; sialorreia; tetania; tremor; tenesmo); (B) Alteração de postura ou locomoção (andar em círculos; ataxia; dobramento do boleto; incoordenação; prostração; queda frequente sem motivação aparente); (C) Alteração comportamental (agressividade, excitabilidade ou medo sem motivação aparente; apetite anômalo; coicear anormal e persistente quando ordenhada; consciência alterada; depressão; hesitação em portas, portões, barreiras; lambedura anormal e excessiva do nariz e flanco; mudança de hierarquia no rebanho; ranger de dentes) e (D) Morte súbita.

A informação sobre a presença de ovinos e o trânsito de animais entre propriedades foi obtida através de contato telefônico com os proprietários. Todos os dados (identificação dos animais, resultados das análises, sexo, idade, município, proprietário e presença de ovinos ou trânsito animal) foram organizados em uma planilha eletrônica que permitiu a análises dos dados através de tabelas dinâmicas e análises estatísticas.

2.3. Análises

A imunofluorescência direta (IFD) foi realizada para detecção de antígeno rábico (Rupprecht et al., 2018a) e as amostras negativas, que tinha histórico de exposição de humanos, foram testadas na prova biológica, através da inoculação intracerebral em camundongos lactentes (Rupprecht et al., 2018b). A extração de DNA foi realizada de acordo com o manual do kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Para a investigação de OvHV-2 foi realizada uma Nested-PCR (Martins et al., 2017) e para detecção de BoHV-1 e BoHV-5 foi utilizada uma PCR em tempo real (Rodenbusch et al., 2020). Para a investigação de *Babesia* spp. foi realizada a PCR que detecta um fragmento de gene 18S do rRNA específico para a família Babesiidae (de Souza et al., 2019). A confirmação da espécie foi realizada através do sequenciamento e BLAST do fragmento amplificado. O gene GAPDH foi utilizado como controle da extração e PCR em todas as mostras negativas (Cerva et al., 2014).

2.4. Sequenciamento

Foram encaminhadas para o sequenciamento, as mostras que apesar de terem o tamanho de fragmento esperado, continham quantidade suficiente para a análise. O sequenciamento foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher) (Massachusetts, USA) equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems) (Massachusetts, USA). Os DNA-moldes foram purificados com o reagente ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) (Massachusetts, USA) e quantificados no equipamento Nanodrop 2000 c (Thermo Fisher Scientific) (Massachusetts, USA). Após isso, os DNAs moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de iniciadores específico (MCF – 556 - 5'GTC TGG GGT ATA TGA ATCCAG ATG GCT CTC 3' para FCM e BAB143-167 - 5'-CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC A-3' para a Família Babesiidae) e 0,5 µl do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) (Massachusetts, USA) em um volume final de 10 µl.

2.5. Análise estatística, filogenética e mapas

O software estatístico STATA (Texas, Estados Unidos) foi usado para as análises estatísticas utilizando o teste de proporções entre duas amostras (Qui quadrado), considerando um nível de confiança de 0,95. Os softwares BioEdit v. 7.2.5 (Carolina do Norte, USA), BLAST (Bethesda, USA) e ClustalW (Dublin, Irlanda) foram usados para analisar as sequências. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v. 10.2.4 (Tempe, USA) foi usado para a análise filogenética. A árvore foi gerada por um algoritmo de união de vizinhos usando parâmetros do modelo evolutivo Kimura 2 com 1000 réplicas de Bootstrap. Os mapas foram construídos no software TerraView v. 4.2.2 do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (São Paulo, Brasil).

3. Resultados

Das 85 amostras analisadas, 47 (55,3%) foram positivas para um ou mais agentes e 38 (44,7%) foram negativas em todas as análises. As amostras negativas na detecção dos agentes foram positivas na PCR para GAPDH, demonstrando que não houve perda de DNA durante o processo de extração. Nenhuma amostra foi positiva para BoHV-1. Entre as positivas para os agentes <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v29i4.96523>

pesquisados, 32 foram positivas somente para raiva, cinco positivas somente para família Babesiidae, cinco positivas somente para OvHV-2 e uma positiva apenas para BoHV-5. A PCR em tempo real para BoHV-5 apresentou um ciclo de quantificação (Cq) alto (Cq = 33,2), sugerindo baixa carga viral na amostra. Outras três foram positivas para raiva e OvHV-2 e uma foi positiva para raiva e *Babesia* spp. Das 6 amostras positivas para *Babesia* spp., 4 delas foram positivas na meninge e 2 no encéfalo. A única que também foi positiva para raiva, foi positiva na meninge. A Figura 1 ilustra a porcentagem dos agentes detectados nas amostras testadas.

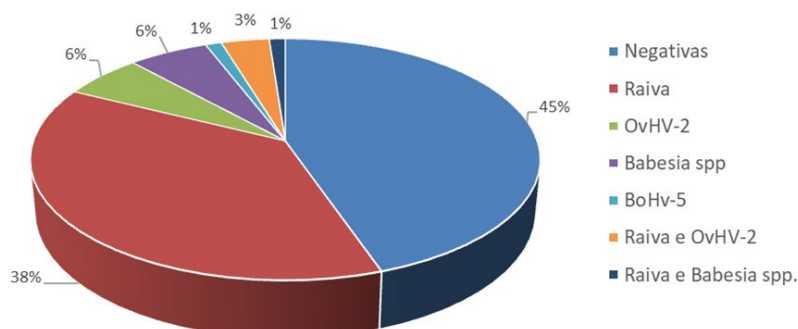


Figure 1 – Resultados das investigações do vírus da raiva, OvHV-2, BoHV-5 e *Babesia* spp. em encéfalos bovinos no RS em 2018, expressos em porcentagem.

Devido ao número reduzido de amostras positivas para BoHV-5, OvHV-2 e *Babesia* spp. não foi possível determinar associação entre as variáveis doença, sexo, idade ou município. A detecção de raiva apresentou uma associação significativa com os sinais clínicos de alteração de postura ou locomoção, como andar em círculos; ataxia; dobramento do boleto; incoordenação; prostração e queda frequente sem motivação aparente ($P < 0,00001$).

As amostras foram provenientes de 48 municípios diferentes, sendo que 25 tiveram identificação de pelo menos 1 agente investigado (Tabela 1).

Município	Amostras	Agente Identificado			
		Vírus da raiva	BoHV-5	<i>Babesia</i> spp.	OvHV-2
Arambaré	2	1	0	2	0
Camaquã	6	1	0	1	1
Canudos do Vale	1	1	0	0	0
Caxias do Sul	1	0	0	0	1
Cerro Grande do Sul	1	1	0	0	0
Chuívisca	2	2	0	0	0
Dom Feliciano	3	2	0	0	2
Encruzilhada do Sul	1	1	0	0	0
Estância Velha	1	1	0	0	0
Garruchos	1	1	0	0	0
Gramado	1	1	0	0	0
Itati	2	1	0	1	0
Maçambará	1	1	0	0	0
Muliterno	2	1	0	0	1
Pantano Grande	2	1	0	0	0
Progresso	6	6	0	0	0
Riozinho	1	1	0	0	0
Santa Maria do Herval	1	0	0	0	1
São Borja	2	1	0	1	0
São Francisco de Paula	4	0	1	0	1
São Lourenço do Sul	1	1	0	0	0
Sério	10	8	0	0	1
Tapes	4	2	0	0	0
Três Forquilhas	2	1	0	0	0
Triunfo	1	0	0	1	0
TOTAL	59	36	1	6	8

Tabela 1 – Municípios do Rio Grande do Sul que foram positivos para um ou mais agentes pesquisados no encéfalo de bovinos, com síndrome neurológica em 2018.

A Figura 2 ilustra a distribuição dos municípios com amostras positivas para raiva, OvHV-2, *Babesia* spp. e BoHV-5. Os municípios que enviaram amostras negativas foram Alegrete, Amaral Ferrador, Arroio do Padre, Arroio do Tigre, Boqueirão do Leão, Brochier, Capivari do Sul, Fontoura Xavier, Ivoti, Machadinho, Mariana Pimentel, Marques de Souza, Montenegro, Nova Prata, Osório, Parai, Porto Alegre, Rosario do Sul, Santo Antônio da Patrulha, Sentinela do Sul, Travesseiro, Uruguaiana e Viamão.

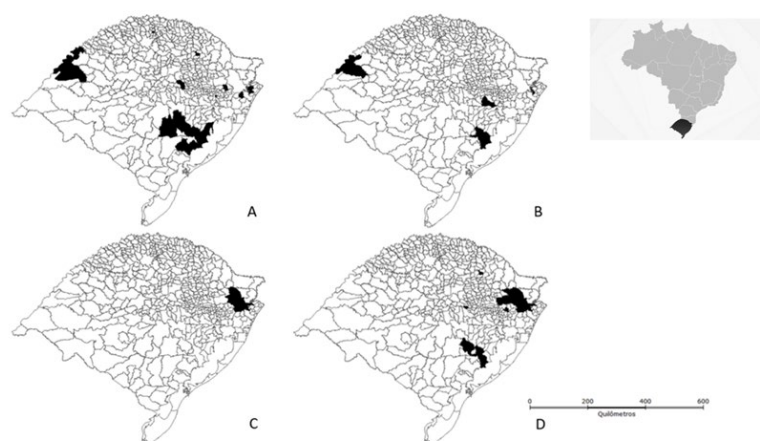


Figura 2 – Mapa do Brasil em cinza, na parte superior direita, com o estado do Rio Grande do Sul destacado em preto. Mapas com a localização dos municípios com amostras positivas para raiva (A), *Babesia* spp. (B), herpesvírus bovino tipo 5 (C) e herpesvírus ovino tipo 2 (D) em encéfalos de bovinos em 2018.

A idade dos animais variou de dois meses a 6 anos e quanto ao sexo, 46 eram fêmeas, 30 eram machos e 9 não foi informado o sexo na ficha. Devido ao número reduzido de amostras positivas para BoHV-5, OvHV-2 e *Babesia* spp. não foi possível fazer associação entre os agentes, sexo e idade. As amostras positivas para raiva foram analisadas quanto a associação entre idade (categorizada por anos) e sexo e não se identificou associação estatística significativa entre as variáveis ($P = 0,336915$ e $P = 0,151898$ respectivamente para idade e sexo). Das oito propriedades com detecção de OvHV-2, somente uma tinham ovinos, as demais tinham histórico de movimentação de animais nos últimos 6 meses.

Ao longo do ano, fevereiro e março foram os meses com menor número de amostras enviadas. Observou-se a identificação de raiva em quase todos os meses, com exceção de outubro e a identificação de OvHV-2 concentrada nos meses de setembro a dezembro (Figura 3).

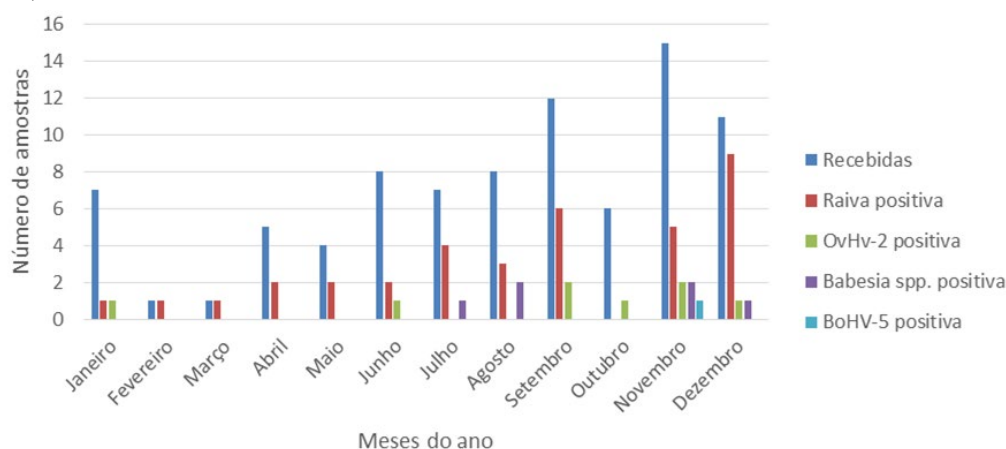


Figura 3 – Distribuição das amostras de encéfalos de bovinos com síndrome neurológica recebidas ao longo de 2018 no laboratório e o resultado da detecção de raiva, BoHV-5, OvHV-2 e *Babesia* spp.

Foi realizado o sequenciamento de quatro das oito amostras positivas para OvHV-2 na nested-PCR. A comparação das sequências através do software BLAST demonstrou que as sequências parciais de nucleotídeos apresentaram entre 87-100% de similaridade com outras sequências de OvHV-2 depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As três amostras que apresentaram as melhores sequências obtidas foram utilizadas para construção de uma árvore filogenética (Figura 4). As amostras PG113 e PG1588 apresentaram a mesma sequência de nucleotídeos e a amostra PG1012 apresentou alteração em um único nucleotídeo em comparação com as demais. As sequências PG113, PG1012 e PG1588 foram depositadas no GenBank, respectivamente, com os números OR193003, OR193004 e OR193005.

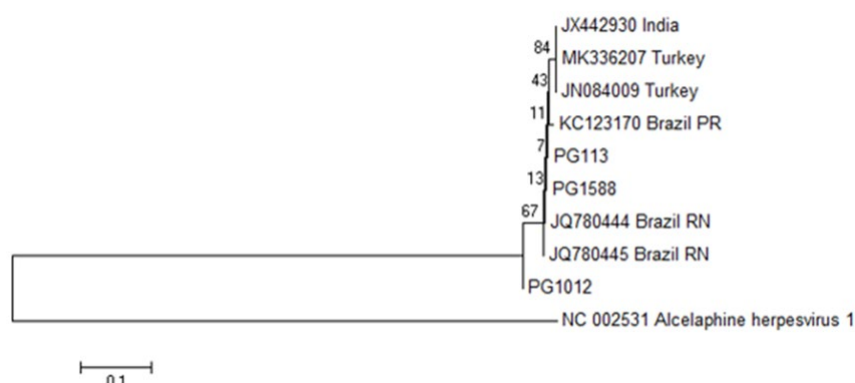


Figura 4 – Relação filogenética construída a partir do alinhamento de sequências parciais de nucleotídeos (PG113, PG1012 e PG 1588) identificados no RS, com sequências de OvHV-2 disponíveis no GenBank, provenientes da Índia, Peru e Brasil (Paraná – PR e Rio grande do Norte – RN).

Das seis amostras positivas para a família Babesiidae, três apresentaram quantidade suficiente de produto de amplificação. Estas amostras foram encaminhadas para sequenciamento, sendo uma amostra positiva na meninge, uma positiva no encéfalo e a amostra positiva para *Babesia* spp. e raiva também na meninge. A amostra de encéfalo e a da meninge negativa para raiva foram identificadas como *B. bovis* no BLAST com uma porcentagem de similaridade variando entre 92 e 99%. A amostra de meninge positiva para raiva foi identificada como *B. bigemina*, com porcentagem de similaridade variando de 95 a 97%.

4. Discussão

Das 85 amostras analisadas no ano de 2018, 55% foram positivas para algum dos agentes pesquisados (Figura 1). Entre as 47 positivas, a raiva foi a doença viral mais identificada, com 38% das amostras testadas sendo positivas somente para raiva, 6% para OvHV-2, 6% para *Babesia* spp. e 1% para BoHV-5. Dados semelhantes do RS já haviam sido relatados na literatura, com porcentagem de raiva variando entre 36% e 41% entre 2016 e 2019 (Cappelari et al, 2021) e variando entre 41% e 65% entre 2011 e 2015 (Rodenbusch et al, 2016). No Paraná, a porcentagem de raiva bovina identificada entre 1977 e 2012 foi de 30% (Dognani et al., 2016). Comparativo com outras doenças virais, temos 29,41% de raiva em Goiás, comparado a 15,88% de meningoencefalites causada por herpesvírus bovinos e 1,7% de febre catarral maligna (Terra et al, 2018). Assim como no Mato Grosso do Sul, com 15,92% de raiva e 4,31% de meningoencefalite por herpesvírus (4,31%) (Ribas et al, 2013). No Equador, entre janeiro de 2014 a dezembro de 2019, um total de 846 fazendas apresentaram casos suspeitos de raiva animal, dos quais 390 (46%) foram bovinos positivos (Briceño-Loaiza et al, 2024).

Foi identificada a coinfeção entre raiva e OvHV-2 em três animais e entre raiva e *B. bigemina* em um animal. A coinfeção entre raiva e BoHV- 1 e 5 já foi relatada em um estudo realizado com amostras de encéfalos bovinos no RS em 1019 onde 22% das amostras positivas para raiva também foram positivas para BoHV-1 ou BoHV-5 e em 5 amostras houve a coinfeção dos 3 agentes (Rodenbusch et al, 2020). As infecções causadas por vírus como os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 e o OvHV-2 podem se estabelecer de forma latente (Martins et al., 2017; Rodenbusch et al., 2020), o que sugere que a raiva tenha sido a *causa mortis* desses animais, visto que a raiva é uma doença progressiva de curso fatal (Mello et al, 2019). No Brasil, há somente duas espécies responsáveis pela babesiose em bovinos. A *B. bovis* é uma babesia pequena e mais letal, devido ao fato dela causar choque hipotenso e distúrbios de coagulação. A babesiose por *B. bigemina* causa uma doença mais branda (Silva et al., 2018; Pupin et al., 2019), o que sugere que a *causa mortis* do animal com coinfeção por raiva e *B. bigemina* tenha sido a raiva.

Das amostras positivas para *Babesia* spp. encaminhadas para sequenciamento, duas foram positivas para *B. bovis* e uma para *B. bigemina*. O resultado positivo para *B. bigemina* foi obtido através da amostra de meninge, já os resultados positivos para *B. bovis*, foram positivos tanto no córtex quanto nas meninges. Nas infecções por *B. bovis* pode ocorrer o sequestro de eritrócitos parasitados nos capilares do cérebro, já que a *B. bovis* tem tamanho menor (Silva et al., 2018). Devido ao pequeno número de amostras que possuíam as meninges, não foi possível associar a identificação das espécies de babesias com os tecidos amostrados (encéfalo ou meninge). Por outro lado, a PCR utilizada foi capaz de identificar *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de encéfalos.

Foi evidenciada uma associação significativa entre os sinais clínicos que incluem alteração de postura e locomoção (andar em círculos; ataxia; dobramento do boleto; incoordenação; prostração; queda frequente sem motivação aparente) e a presença do vírus da raiva. Bovinos com raiva desenvolvem uma série de sinais clínicos da doença que levam progressivamente à morte. Os sinais iniciais incluem inapetência e podem progredir para hipersalivação, causada por disfagia e incoordenação (Johnson e Montañó-Hirose, 2018). A doença geralmente se inicia com o isolamento voluntário do animal, apatia, perda do apetite, podendo haver sensibilidade e prurido na região da mordedura. Evolui com vocalização constante, tenesmo, hiperexcitabilidade, aumento da libido, salivação abundante, dificuldade para engolir, movimentos desordenados da cabeça, ranger de dentes, midríase com ausência de reflexo pupilar, incoordenação motora, andar cambaleante e contrações musculares involuntárias. Após entrar em decúbito lateral, o animal não consegue mais se levantar e apresenta movimentos de pedalagem, dificuldade respiratória, opistótono, asfixia e morte, que ocorre geralmente entre 3 e 6 dias após o início dos sinais, podendo em alguns casos, ocorrer em até 15 dias (MAPA, 2020). Os animais contaminados podem apresentar alguns desses sinais. A maior prevalência de determinados

sinais clínicos pode estar associada às diferentes sublinhagens do vírus da raiva. No RS circulam duas sublinhagens da variante 3 (variante do *Desmodus rotundus*, morcego transmissor da raiva para os herbívoros). A sublinhagem A1 que circula entre o RS, regiões nordeste e norte do Brasil e Equador, e a sublinhagem 1B que circula entre RS, Santa Catarina, Uruguai e Argentina (Fernandes et al, 2020). Porém, estudos dirigidos devem ser conduzidos para elucidar essa hipótese.

Devido ao número reduzido de amostras positivas para raiva, BoHV-5, OvHV-2 e *Babesia* spp. não foi possível determinar associação entre as variáveis doença e a localização geográfica (município). Sendo assim, a distribuição espacial das amostras positivas identificadas neste trabalho (Figura 2) não permite identificar áreas com maior ocorrência das doenças. Todavia, um estudo de distribuição espaço temporal da raiva bovina no RS, entre os anos de 2011 e 2015, identificou as regiões Metropolitana de Porto Alegre e Sudeste do Estado como as com maior ocorrência de raiva bovina no período (Rodenbusch et al, 2016).

A presença do OvHV-2 foi identificada em 8 amostras (Tabela 1), com maior número de ocorrência entre os meses de setembro a dezembro (Figura 3). Ovinos saudáveis infectados com OvHV-2 eliminam o vírus infeccioso intermitentemente, principalmente por meio de secreções nasais, mas também pelos tratos alimentar e urogenital, principalmente na época de parição. Esses ovinos são a principal forma de transmissão para bovinos (Martinez et al, 2021). No RS, o período de parição dos ovinos é entre junho e setembro (Ribeiro et al, 2002; Jacondino 2016) e o período de incubação em bovinos é de 3 semanas a 5 meses (Martinez et al, 2021), o que pode explicar a identificação do OvHV-2 nos bovinos entre os meses de setembro a dezembro, visto que em uma propriedade havia ovinos e as demais tinham histórico de trânsito animal nos últimos 6 meses.

A árvore filogenética (Figura 4) construída com as amostras de OvHV-2 encontradas nesse trabalho e outras descritas em outras partes do mundo, não mostra diferenças genômicas significativas. A ausência de sequências produzidas com os mesmos iniciadores, nos bancos de genomas, não permite a comparação com mais amostras além dessas. Apesar da amostra PG1012 permanecer isolada das demais, semelhante ao que ocorreu com a amostra 8013-13/Silva Jardim do Rio de Janeiro (Martins et al., 2017), faz-se necessário ampliar o número de amostras sequenciadas e depositadas nos bancos de genomas para que se possa ter uma comparação mais robusta.

O BoHV-5 circula no rebanho bovino do RS, sendo o mais frequente em relação ao BoHV-1 (Rodenbusch et al, 2020). A carga viral encontrada para BoHV-5 ($C_q = 33,2$) sugere uma infecção lactente. A latência dos herpesvírus em encéfalos de bovinos no RS já foi descrita através da PCR em tempo real do encéfalo dos animais (Rodenbusch et al., 2020) e do nervo trigêmeo através de uma nested-PCR, demonstrando inclusive a coinfeção entre BoHV-1 e BoHV-5 (Campos et al, 2009).

5. Conclusão

A raiva foi a doença neurológica mais detectada nos bovinos com síndrome neurológica em 2018 no RS. Babesiose cerebral, febre catarral maligna e meningoencefalite causada por herpesvírus devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas em bovinos e coinfeções podem ocorrer.

Agradecimento: Programa de Pós-graduação em Saúde Animal do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

6. References

- Briceño-Loaiza C, Fernández-Sanhueza B, Benavides-Silva C, et al. Spatial clusters, temporal behavior, and risk factors analysis of rabies in livestock in Ecuador. *Prev Vet Med*, 226; 106188, 2024. (DOI: 10.1016/j.prevetmed.2024.106188)
- Campos FS, Franco AC, Hubner SO, et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol*, 139; 67–73, 2009. (DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.05.015)
- Cappelari BE, Silveira JG, Rosa JCA et al. Bovine rabies in Rio Grande do Sul: positivity rates, geographical distribution, and seasonal occurrence. *Acta Vet Bras*, 15; 267-274, 2021. (DOI: 10.21708/avb.2021.15.4.10072)
- Cerva C, Bremm C, dos Reis EM., et al. Food safety in raw milk production: Risk factors associated to bacterial DNA contamination. *Trop Anim Health Prod*, 46; 877–882, 2014. (DOI: 10.1007/s11250-014-0580-y)
- de Souza VK, Dall'Agnol B, Souza UA, et al. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. *Parasitol Res*, 118; 1337–1342, 2019. (DOI: 10.1007/s00436-019-06245-6)
- Dognani R, Pierre EJ, Silva MCP, et al. Epidemiologia descritiva da raiva dos herbívoros notificados no estado do Paraná entre 1977 e 2012. *Pesq Vet Bras*, 36; 1145–1154, 2016. (DOI:10.1590/S0100-736X2016001200001)
- Fernandes MES, Carnieli P, Gregório ANF, et al. Phylogenetic analysis of rabies viruses isolated from cattle in southern Brazil. *Virus Genes* 56; 209-216, 2020. (DOI: 10.1007/s11262-020-01730-y)
- Gonçalves TL, Christofari LF, Oaigen RP, et al. Phenotypic and genotypic characteristics on calves' sale price on the western border of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc Rural*, 48: 4; e20170283, 2018. (DOI: 10.1590/0103-8478cr20170283)
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Rebanho de Bovinos. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br> Acesso em 09/12/2024.
- Jacondino LR. Fase preparatória do parto de ovelhas: manifestações clínicas indicadoras da parição iminente e avaliação de marcador metabólico. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 46p. 2016.
- Johnson N, Montaña-Hirose JA. The impact of paralytic bovine rabies transmitted by vampire bats in Latin America and the Caribbean. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 37;(2); 451-459, 2018. (DOI: 10.20506/rst.37.2.2814)
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ficha Técnica. Raiva dos Herbívoros.2p. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/fichas-tecnicas-legislacao-manuais-e-demaais-documentos> Acesso em 09/12/2024.
- Martinez HS, Al-Saadi M, Stewart JP, et al. Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever: Role of Latent Virus and Macrophages in Vasculitis. *Vet Pathol*, 58;(2); 332-345, 2021. (DOI: 10.1177/0300985820978310)

<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v29i4.96523>

- Martins MSN, Castro AMMGD, Lima MS, et al. Malignant Catarrhal Fever in Brazilian cattle presenting with neurological syndrome. *Braz J Microbiol*, 48; 366–372, 2017. (DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.021)
- Mello AKM, Brumatti RC, Neves DA, et al. Bovine rabies: economic loss and its mitigation through antirabies vaccination. *Pesq Vet Bras* 39:(3); 179-185, 2019. (DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6201)
- Pupin RC, Guizelini CC, Lemos RAA, et al. Retrospective study of epidemiological, clinical, and pathological findings of bovine babesiosis in Mato Grosso do Sul, Brazil (1995 –2017). *Ticks Tick-borne Dis*, 10; 36-42, 2019. (DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.08.015)
- Ribas NLS, Carvalho RI, Santos AC, et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. *Pesq Vet Bras*, 33:(10); 1183-1194, 2013. (DOI: 10.1590/S0100-736X2013001000003)
- Ribeiro LAO, Gregory RM, Mattos RC. Prenhez em rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul. *Cien Rural*, 32:(4); 637-641, 2002.
- Rodenbusch CR, Ferreira JC, Rosa JCA, et al. Spatial and Temporal Description of Laboratory Diagnosis of Bovine Rabies in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Sci Vet*, 44; 1411, 2016. (DOI: 10.22456/1679-9216.81212)
- Rodenbusch CR, Ferreira JC, Cunha DLBW, et al. Molecular evidence of bovine herpesvirus 1 and 5 in cattle with suspected rabies in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Com Immunol Microbiol Infect Dis* 73; 101495, 2020. (DOI: 10.1016/j.cimid.2020.101495)
- Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B. The direct fluorescent antibody test. In: _____. *Laboratory Techniques in Rabies*. 5th ed. Geneva: WHO, 2018a. p. 108–129.
- Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B. Virus isolation in animals: the mouse inoculation test. In: _____. *Laboratory Techniques in Rabies*. 5th ed. Geneva: WHO, 2018b. p. 74–84.
- Sanches AWD, Langohr IM, Stigger AL, et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20; 113-118, 2000. (DOI: 10.1590/S0100-736X2000000300005)
- Silva TM, Aresco WVC, Faccin TC, et al. Caracterização histoquímica no diagnóstico da babesiose bovina por *Babesia bovis*. *Pesq Vet Bras* 38:(4); 649-658, 2018. (DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5254)
- Terra JP, Blume GR, Rabelo RE, et al. Neurological diseases of cattle in the state of Goiás, Brazil (2010-2017). *Pesq Vet Bras*, 38:(9); 1752-1760, 2018. (DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5768)