

até a sétima passagem (P7). A suspensão 10% resultante por passagem foi utilizada para a detecção do RNA viral por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). O SNC e os órgãos de dois animais por passagem foram fixados em formol tamponado a 10%, processados segundo a técnica de inclusão em parafina e corados com hematoxilina e eosina. Alterações vasculares como hipermia e hemorragia foram visualizadas no SNC durante a terceira passagem (P3) em cérebros de camundongos, assim como alterações circulatórias sistêmicas caracterizadas por edema subcutâneo de membros e necrose de extremidades. A partir da quarta passagem (P4), alterações comportamentais, variando de hiperexcitabilidade à apatia, começaram a ser observadas com progressiva evolução até a evidência de sinais neurológicos, identificados por andar em círculos e perda da propriocepção dos animais. Evidente tendência à hemorragia ocorreu a partir da quinta passagem, com ocorrência de hemoperitônio e hematomas subcutâneos, associados ao diagnóstico histológico de hemorragia multifocal acentuada em fígado, coração, rim e pulmão. Durante o estudo, a mortalidade dos camundongos infectados se deu entre o 2º e 3º dpi, chegando a 100% na última passagem (P7). O grupo controle, inoculado com PBS 10%, não apresentou qualquer alteração clínica, macroscópica ou histológica significativa. Amostras de SNC e pool dos órgãos que apresentaram alterações vasculares foram positivas pela RT-PCR específica para SLEV. No presente estudo, manifestações hemorrágicas sistêmicas, característica de outros flavivírus, como o vírus da dengue, foram observadas nos camundongos inoculados com o SLEV. Sinais hemorrágicos associados ao SLEV foram descritos pela primeira vez, no Brasil, durante um surto de Dengue sorotipo 3, em humanos. O processo de adaptação do SLEV em modelo murino permitiu a caracterização da cepa isolada, pela primeira vez no Brasil, a partir do SNC de um equino e confirmou que, além de ser potencialmente neurovirulenta, causando encefalopatia, também está associada a quadros de vasculopatia sistêmica.

\*Bolsista DTI-1 do Edital CNPq/Mapa/SDA No 064/2008, projeto 578385/2008-2.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.  
E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

<sup>2</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Diagnóstico epidemiológico e medidas de controle adotadas pelo serviço oficial em um surto de laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI) no Estado de São Paulo, Brasil

*Epidemiological diagnosis and control measures adopted by the official service in an outbreak of Infections Laryngotracheitis (ILT) of poultry*

Buchala, F.G.<sup>1</sup>; Ishizuka, M.M.<sup>2\*</sup>; Leite, L.O.<sup>1</sup>; Dal Farra M.C.T.<sup>1</sup>; Ferreira, J.P.<sup>3</sup>

A LTI, doença de ocorrência esporádica no Brasil, foi diagnosticada em 2003 com o primeiro caso em aves de postura de ovos comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo (SP), principal região de produção de ovos do país. Um programa de controle foi implantado com a criação de um bolsão (zona de proteção + zona de vigilância), com interdição das propriedades, proibição do trânsito de aves de descarte e dejetos, medidas de biossegurança e introdução de um programa oficial de vacinação massal com uso de vacinas vivas. O último caso foi observado em maio de 2004 e a doença foi considerada

controlada na região. Em 2008, novos casos foram notificados nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Federal e controlados sem uso de vacinas, sendo as principais medidas a interdição das propriedades, abate sanitário das aves, limpeza, desinfecção e vazios sanitários. Este trabalho tem por objetivo reunir ferramentas do diagnóstico epidemiológico (sistema de vigilância passiva com a notificação de ocorrência de doenças, formulários e questionários de investigação epidemiológica, indicadores de saúde, indicadores de produtividade), sinais clínicos de doença respiratória, achados anatomopatológicos, monitoramento sanitário com a utilização de critérios de amostragem, uso das diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial (sorologia ELISA e IDGA, histopatologia, PCR e isolamento). Os resultados obtidos pelas diferentes ferramentas epidemiológicas proporcionaram aos médicos veterinários do SVO de SP a interpretação e obtenção de amplo diagnóstico de situação, com o conhecimento da prevalência (infecção/doença), distribuição geográfica e impacto econômico, que proporcionaram o estabelecimento de medidas compulsórias de profilaxia: delimitação de zona infectada, interdição das propriedades, desinfecção dos veículos, controle do trânsito de aves e ovos, abate sanitário em dois lotes do foco índice, compostagem, proibição da muda forçada, uso de TCO vacinas, vigilâncias ativa e passiva. A doença está controlada com vacinação. A base legal foi constituída pela Portaria CDA nº 6 de 02/11/2011 (estabelece as medidas de profilaxia inespecíficas e específicas para o controle da laringotraqueíte infecciosa das aves, a serem cumpridas pelos estabelecimentos avícolas de postura de ovos comerciais localizados no município de Guataporã e dá outras providências) e Resolução SAA nº58 de 12/14/2010 (estabelece as medidas de profilaxia inespecíficas e específicas para o controle da laringotraqueíte infecciosa das aves, a serem cumpridas pelos estabelecimentos avícolas de produção de ovos comerciais, localizados no município de Guataporã e dá outras providências).

\*Comitê de Sanidade Avícola de São Paulo.

<sup>1</sup>Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Av. Brasil, 2340, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil. <sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, Brasil.

### Encefalites equinas em Minas Gerais e o primeiro isolamento do vírus da encefalite de Saint Louis no Brasil

*Equine Encephalitis in Minas Gerais State and the first isolation of Saint Louis Encephalitis virus in Brazil*

Costa, E.A.<sup>1\*</sup>; Rosa, R.<sup>1</sup>; Oliveira, T.S.<sup>2</sup>; Furtini, R.<sup>2</sup>; Paixão, T.A.<sup>3</sup>; Santos, R.L.<sup>1</sup>

Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) é o órgão responsável pela execução dos programas sanitários do Mapa. Anualmente, o Laboratório de Saúde Animal do IMA (LSA/IMA) recebe aproximadamente cem amostras de sistema nervoso central de equídeos com sinais neurológicos. Cerca de 36% dessas amostras são positivas para raiva. Logo, grande parte dos casos necessita de diagnóstico diferencial. Em 2004, o LSA/IMA implantou o diagnóstico histopatológico das enfermidades neurológicas. Com isso, outras enfermidades puderam ser diagnosticadas em amostras negativas para raiva. Porém, testes mais específicos ainda são necessários para aumentar a acurácia do diagnóstico e permitir a identificação do agente etiológico envolvido. De janeiro de 2009 a janeiro de 2011, um levantamento dos casos de encefalite e encefalomielite em equinos no Estado de Minas Gerais foi realizado em

amostras de sistema nervoso central (SNC) de equinos que morreram apresentando sinais neurológicos e tiveram amostras colhidas e enviadas para o LSA/IMA. Nove diferentes agentes que causam doença neurológica em equinos foram pesquisados: raiva, herpesvírus equino 1 (EHV-1), herpesvírus equino 4 (EHV-4), vírus da encefalite equina do leste (EEEV, do inglês *Eastern equine encephalitis virus*), vírus da encefalite equina do oeste (WEEV, do inglês *Western equine encephalitis virus*), vírus da encefalite venezuelana (VEEV, do inglês *Venezuelan equine encephalitis virus*), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV, do inglês *Saint Louis encephalitis virus*), vírus da encefalite de West Nile (WNEV) e *Sarcocystis neurona*, agente da mieloencefalopatia protozoária. Das 217 amostras de SNC, 47 (21,7%) foram positivas para o vírus da raiva pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos. Nas 170 amostras restantes, negativas para o vírus da raiva, o DNA do EHV-1 foi detectado em 20 (11,8%) e o cDNA do SLEV em uma amostra, pelas técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), respectivamente. Das amostras de SNC acondicionadas em formol, 10% foram avaliadas histologicamente. Alterações circulatórias como hiperemia e hemorragias multifocais, associadas ou não a trombo vascular, foram frequentes nas infecções por EHV-1 e raiva e obtiveram diferença significativa quando comparadas com os animais negativos. Para confirmar o diagnóstico, os produtos de PCR obtidos foram sequenciados e os vírus isolados em cultivo celular. O presente estudo demonstrou que o vírus da raiva é o principal agente causador de encefalite em equinos, apesar do crescente número de casos de encefalomielite associados ao EHV-1 no Estado de Minas Gerais. No entanto, apesar de evidências sorológicas comprovarem a circulação do SLEV no Brasil, este foi o primeiro relato de isolamento do SLEV do sistema do SNC de um equino que morreu com sinais neurológicos no País.

\*Bolsista DTI-1 do Edital CNPq/Mapa/SDA N° 064/2008, projeto 578385/2008-2.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.  
E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

<sup>2</sup>Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Investigation of neurological diseases in equine tested negative for rabies

*Investigação de doenças neurológicas em equinos testados negativos para raiva*

Cunha, E.M.S.<sup>1</sup>; Lara, M.C.C.S.H.<sup>1</sup>; Villalobos, E.M.C.<sup>1</sup>; Nassar, A.F.C.<sup>1</sup>; Del Fava, C.<sup>1</sup>; Scannapieco, E.M.<sup>1\*</sup>; Cunha, M.S.<sup>1</sup>; Mori, E.<sup>2</sup>; Gomes, M.N.<sup>3</sup>

There are several central nervous system (CNS) diseases that can infect horses, and the differential diagnoses are therefore necessary. Clinically these diagnoses are often difficult once the degrees of ataxia and paresis are similar. The most commonly encountered abnormalities that may result in neurological dysfunction include trauma, equine herpesvirus, Eastern, Western and Venezuelan equine encephalomyelitis (EEE, WEE, VEE), leukoencephalomalacia, protozoan myeloencephalitis and bacterial encephalitis. The aim of this work was to identify the main diseases with neurological signs in equine after negative diagnosis for rabies. From April 2007 to June 2011, 167 samples of CNS

from animals that have died with neurological signs were submitted for rabies diagnosis by FAT (fluorescent antibody test) and MIT (mouse inoculation test). Those tested negative were further submitted to other analysis. Samples of the CNS were inoculated in cell culture and submitted to PCR for detection of herpesvirus and equine encephalomyelitis. In order to investigate the growth of bacteria, isolation in 5% blood agar and biochemical identification was performed. For the histological examination, CNS tissue samples were placed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin eosin. Our data confirmed rabies in 23 (13,8%) cases. Of 144 samples tested negative for rabies, 10 (7,0%) were positive for leukoencephalomalacia, 4 (2,8%) for herpetic myeloencephalitis and 12 (8,3%) for bacterial encephalitis. This study highlights the importance of including different diagnosis in samples from equine with neurological disease.

Financial support: CNPq/Mapa.

\*Bolsista CNPq/MAPA.

<sup>1</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: cunha@biologico.sp.gov.br

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Defesa Animal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

### Caracterização molecular do genoma de cepas do vírus da raiva correlacionadas à imunopatologia e desenvolvimento de RT-PCR em tempo real

*Molecular Characterization of rabies virus strains correlated with immunopathology and the development of a real-time RT-PCR*

Casseb, L.M.N.<sup>1</sup>; Barbosa, T.F.S.<sup>1</sup>; Travassos da Rosa, E.S.<sup>1</sup>; Pereira, A.S.<sup>1</sup>; Nunes, M.R.T.<sup>1</sup>; Medeiros, D.B.A.<sup>1</sup>; Quaresma, J.A.S.<sup>2</sup>; Fernandes, E.R.<sup>3</sup>; Duarte, M.I.S.<sup>3</sup>; Vasconcelos, P.F.C.<sup>1</sup>

O projeto visa a caracterizar molecularmente o genoma de cepas de raiva (variantes antigênicas 2 e 3) e sua associação com a patogenicidade, bem como realizar a quantificação do RNA viral por RT-PCR em tempo real. Foram realizados os procedimentos de infecção experimental em camundongos albinos suíços com idade de 21 dias com duas cepas em diferentes vias de administração. Os animais foram observados diariamente e as coletas iniciaram-se a partir do 5º dia pós-inoculação. Foram obtidas sequências nucleotídicas do genoma completo do VRab em sequenciador 454 e também foram obtidos amplicons de 490 pb determinados entre as posições 868 e 1359 da nucleoproteína pelo método de Sanger. Os produtos obtidos pelo método de pirosequenciamento estão sendo montados para análise filogenética e genômica. Observou-se que os animais infectados pela via intracerebral foram a óbito até o 15º dia PI, e alguns animais infectados pelas vias musculares permanecem em observação sem apresentar sinais de doença, mesmo após 90 dias. Das amostras coletadas dos animais, parte está armazenada em freezer a -70º C para estudos posteriores e parte foi fixada em formol e está sendo incluída em parafina para proceder aos estudos histológicos e de imunohistoquímica. O estudo desenvolvido até o momento permitiu as seguintes conclusões: foi possível obter produtos do genoma completo pelo método de pirosequenciamento das amostras em estudo, que estão em análise; os anticorpos para imunohistoquímica estão sendo adquiridos, bem como o treinamento de recursos humanos para realização das técnicas histológicas e de imunohistoquímica.

Apoio Financeiro: MCT/ CNPq/ Mapa / SDA n° 64/2008.