

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BEZERROS COM
RECOMBINANTES DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO
5 COM DELEÇÕES NOS GENES DA
GLICOPROTEÍNA E, TIMIDINA QUINASE E AMBOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cyndia Mara Bezerra dos Santos

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BEZERROS COM
RECOMBINANTES DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5
COM DELEÇÕES NOS GENES DA GLICOPROTEÍNA E,
TIMIDINA QUINASE E AMBOS**

por

Cyndia Mara Bezerra dos Santos

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

S237i Santos, Cyndia Mara Bezerra dos.

Infecção experimental de bezerros com recombinantes do herpesvírus bovino tipo 5 com deleções nos genes da glicoproteína E, timidina quinase e ambos / Cyndia Mara Bezerra dos Santos ; orientador Eduardo Furtado Flores. – Santa Maria, 2010.

35 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.

1. Medicina Veterinária. 2. Recombinantes. 3. Bovinos. 4. Glicoproteínas. 5. Vacinas. 6. Herpesvírus I. Flores, Eduardo Furtado.

Denise Barbosa dos Santos
CRB10 / 1456

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BEZERROS COM
RECOMBINANTES DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 COM
DELEÇÕES NOS GENES DA GLICOPROTEÍNA E, TIMIDINA
QUINASE E AMBOS**

elaborada por
Cyndia Mara Bezerra dos Santos

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof. Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/Orientador)**

Ivomar Oldoni, PhD (Brasil Foods)

Luizinho Caron, Dr. (Embrapa, CNPSA)

Santa Maria, 01 de Outubro de 2010.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, por tudo que tenho e sou.

À minha mãe, Nilza Picoli, pelo amor incondicional, confiança e compreensão. Sem você nada seria possível, meu muito obrigada.

Aos meus irmãos Telma e Arthur, pelo incentivo e o amor dedicados mesmo à distância, e a meus avós Davilina e Lourenço (*in memoriam*), que foram responsáveis pelo incentivo constante aos meus estudos. Muito obrigada de coração.

Ao professor Eduardo Furtado Flores pela orientação e supervisão e aos professores Rudi Weiblen e Luciane T. Lovato por compartilhar seus conhecimentos. Agradeço ainda a oportunidade que me deram para fazer parte do Setor de Virologia.

Aos colegas do Setor de Virologia, bolsistas, mestrandos, doutorandos e funcionários pelo auxílio nos experimentos e companheirismo.

Aos meus amigos Sandra Arenhart e Fernando V. Bauermann, pelo conhecimento compartilhado e principalmente pela amizade. Meu sincero muito obrigado, tendo a certeza de que cada um de vocês contribuiu com o que sou hoje.

Aos professores do PPGMV, pelo conhecimento repassado, contribuindo para a minha formação.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária que oportunizou toda a minha formação acadêmica.

Resumo

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BEZERROS COM RECOMBINANTES DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 COM DELEÇÕES NOS GENES DA GLICOPROTEÍNA E, TIMIDINA QUINASE E AMBOS

Autor: Cyndia Mara Bezerra dos Santos

Orientador: Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, 01 de outubro de 2010.

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente de doença neurológica grave em bovinos. A utilização de vacinas recombinantes tem sido preconizada para o controle da infecção pelo BoHV-5. O objetivo do presente trabalho foi investigar a patogenia, em bezerros, de três recombinantes do BoHV-5, com deleções nos genes da glicoproteína E (BoHV-5gE Δ), da enzima timidina quinase (BoHV-5TK Δ) ou ambos (BoHV-5gETK Δ) para uso potencial em vacinas. Para isso, quatro grupos de bezerros com 80 a 90 dias de idade foram inoculados pela via intranasal (IN) com um dos recombinantes ou com a cepa parental (SV507/99) e monitorados nos dias seguintes à inoculação. Os animais inoculados com o vírus parental (SV507/99) excretaram vírus por um período médio de 12,3 dias (título máximo $10^{6,8}$ DICC₅₀/mL), no grupo BoHV-5gE Δ por 11 dias ($10^{5,1}$ DICC₅₀/mL), no grupo BoHV-5TK Δ por 9,6 dias ($10^{5,9}$ DICC₅₀/mL) e no grupo BoHV-5gETK Δ por 6,2 dias ($10^{4,7}$ DICC₅₀/mL). Os animais inoculados com os vírus recombinantes não desenvolveram sinais respiratórios ou sistêmicos importantes; dois animais do grupo SV507/99 apresentaram doença neurológica e foram sacrificados *in extremis*. No dia 32 pós-inoculação (pi), todos os animais inoculados com o SV507/99 e BoHV-5gE Δ haviam soroconvertido (títulos de 4 a 8), enquanto nos grupos BoHV-5TK Δ e BoHV-5gETK Δ , dois e quatro animais soroconverteram (títulos de 2 a 8), respectivamente. No dia 42 pi, realizou-se a administração de dexametasona (Dx) na tentativa de reativar a infecção latente. Após a administração de Dx, os animais dos grupos BoHV-5gE Δ e BoHV-5TK Δ excretaram vírus por um ou dois dias. Os animais do grupo BoHV-5gETK Δ não excretaram vírus, enquanto a excreção pelos animais do grupo inoculado com o vírus parental foi mais duradoura e em maiores títulos. No dia 30 pós-Dx, os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta do encéfalo para a pesquisa de DNA latente por PCR. Não foi detectado DNA viral no encéfalo dos animais inoculados com o BoHV-5TK Δ e BoHV-5gETK Δ , enquanto no grupo SV507/99 foi detectado em todos os

animais nas diferentes secções. Dentre os animais inoculados com o recombinante BoHV-5gEA, foi verificada uma distribuição de DNA viral restrita, com detecção em apenas uma secção (córtex anterior, ponte ou tálamo) em três animais. Esses resultados demonstram que os recombinantes foram atenuados durante a infecção aguda; apresentaram uma capacidade reduzida de estabelecer infecção latente e não foram facilmente reativados pela administração de Dx. Com isso, constituem-se em potenciais candidatos a cepas vacinais.

Palavras-chave: BoHV-5, virulência, vacina, recombinantes.

Abstract

Master's Dissertation
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPERIMENTAL INFECTION OF CALVES WITH RECOMBINANTS OF BOVINE HERPESVIRUS 5 WITH DELETIONS IN GENES ENCODING GLYCOPROTEIN E, THYMIDINE KINASE AND BOTH

Author: Cyndia Mara Bezerra dos Santos

Adviser: Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, October, 1st, 2010.

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is the etiologic agent of neurological disease in calves. The use of recombinant differential vaccines have been proposed against the disease. This dissertation relates an investigation on the attenuation in calves of three BoHV-5 recombinants with deletions in the coding regions of glycoprotein E (BoHV-5gE Δ), thymidine kinase (BoHV-5TK Δ) or both (BoHV-5gETK Δ) for potential use in vaccines. Each of the four groups of calves was inoculated intranasally with one of the mutants or the wild type virus (wt [SV507/99]) and monitored thereafter. The calves inoculated with wt virus shed virus for an average of 12.3 days ($10^{6.8}$ DICC₅₀/mL), in the group BoHV-5gE Δ for 11 days ($10^{5.1}$ DICC₅₀/mL), in the group BoHV-5TK Δ for 9.6 ($10^{5.9}$ DICC₅₀/mL) and in the group BoHV-5gETK Δ for 6.2 days ($10^{4.7}$ DICC₅₀/mL). No respiratory or systemic signals were observed in animals inoculated with the recombinants, while two calves of the wt group presented neurologic disease and were euthanized *in extremis*. Seroconversion was verified on the 32 days post-inoculation (pi) in all animals of group wt and BoHV-5gE Δ , while 2 and 4 animals of the groups BoHV-5TK Δ e BoHV-5gETK Δ seroconverted, respectively. Aiming at reactivating latent infection, on the 42 days pi, animals were treated with dexamethasone (Dx). Reactivation was achieved in wt group while groups BoHV-5gE and BoHV-5TK Δ shed virus only for one or two days. No virus shedding was verified on group BoHV-5gETK Δ . Euthanasia was executed 30 days later and brain sections were collected for DNA viral detection. Viral DNA was detected in the brain of wt inoculated animals and in restricted brain sections in the BoHV-5gE Δ group. These results demonstrated that mutants are fully attenuated for calves during acute infection and present a reduced ability to establish and/or reactivate latent infection after Dx administration. Therefore these recombinants may be useful in vaccine formulations.

Key words: BoHV-5, virulence, vaccine, recombinants.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 (Fig.1) – Excreção viral nas secreções nasais durante os 14 dias pós-inoculação. As médias diárias dos títulos virais estão expressas em \log_{10} DICC₅₀/mL (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares).....30

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 (QUADRO 1) – Excreção viral e sorologia durante a infecção aguda e latente em bezerros inoculados com recombinantes e a cepa parental do BoHV-5.....28

TABELA 2 (QUADRO 2) – Detecção do DNA viral por PCR durante a infecção latente no encéfalo dos bezerros inoculados com os recombinantes e a cepa parental do BoHV-5.....29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 CAPÍTULO 1. Infecção experimental de bezerros com recombinantes dos herpesvírus bovino tipo 5 defectivos nos genes da glicoproteína E e timidina quinase ou ambos	15
Abstract.....	16
Resumo.....	17
Introdução.....	18
Material e Métodos.....	19
Resultados	20
Discussão.....	22
Referências.....	25
3 REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente de meningoencefalite de curso geralmente fatal em bovinos jovens (STUDDERT, 1989). Esse vírus está classificado na família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ROIZMAN et al., 1992). O BoHV-5 é um vírus DNA de fita dupla linear, envelopado e com simetria icosaédrica. O genoma do BoHV-5 SV-507/99 já foi completamente sequenciado, sendo o primeiro genoma de um herpesvírus bovino a ter sua sequência inteiramente conhecida (DELHON et al., 2003). Com aproximadamente 138 Kb, o genoma do BoHV-5 é composto por uma sequência única curta (US) de 9.5Kb, flanqueada por duas regiões repetidas invertidas (IR) apresentando uma identidade de 80 a 90 % com a sequência equivalente do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (DELHON et al., 2003) e uma região única longa (UL) de 104Kb. O BoHV-5 foi anteriormente considerado um subtipo do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), denominado BoHV-1.3 (ROIZMAN et al., 1992), devido ao BoHV-1 e BoHV-5 apresentarem semelhanças antigênicas, estruturais e moleculares entre si, e principalmente, uma extensa reatividade sorológica cruzada. Entretanto, uma das principais diferenças entre o BoHV-1 e o BoHV-5 está na habilidade de invadir o sistema nervoso central (SNC) e causar doença neurológica (METZLER et al., 1986; FRIEDLI; METZLER, 1987; BELKNAP et al., 1994; ASHBAUGH et al., 1997). Embora o BoHV-1 tenha sido ocasionalmente isolado de casos de meningoencefalite (SILVA et al., 2007b), a maioria dos casos de doença neurológica são associados com o BoHV-5. Esse vírus também tem sido isolado de sêmen de touros saudáveis e de bovinos jovens com infecções generalizadas (SILVA et al., 2007a).

Os alfa herpesvírus apresentam como importante característica a possibilidade de infectar diferentes espécies de animais. O BoHV-5, quando inoculado experimentalmente, pode infectar coelhos, ovinos, caprinos e bovinos (BELTRÃO et al., 2000; SILVA et al., 1999; DIEL et al., 2007; VOGEL et al., 2003). Entretanto, os bovinos são os hospedeiros naturais e, tanto em infecções naturais, como experimentais, pode ser transmitido por contato direto e/ou indireto. Após a infecção, ocorre um ciclo replicativo lítico e curto, em que o vírus faz sua replicação primária (aguda) no trato respiratório superior e posteriormente atinge neurônios regionais, nos quais é transportado até os gânglios responsáveis pela inervação da cavidade nasal, principalmente do nervo trigêmeo e do nervo olfatório (LEE et al., 1999).

Dessa forma, esse vírus pode estabelecer infecção latente em um menor número de neurônios de gânglios sensoriais e autonômicos, a qual pode ser reativada naturalmente ou induzida pela administração de corticosteróides, promovendo a excreção viral e, algumas vezes, a recrudescência clínica (VOGEL et al., 2003). A infecção aguda pode resultar em doença neurológica, que incluem depressão, tremores, bruxismo, salivação, cegueira, protusão da língua, opstótono, ataxia e convulsões (CARRILLO et al., 1983; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). Os sinais neurológicos são progressivos, geralmente levando o animal à morte, porém, animais que apresentam um curso clínico leve a moderado da doença podem se recuperar (BELKNAP et al., 1994).

O BoHV-5 tem sido identificado em vários países, como os Estados Unidos, Europa, Austrália e América do Sul (STUDDERT, 1989). Surtos no Brasil e Argentina têm sido descritos com maior frequência (SILVA et al., 2007a; CARRILLO et al., 1983; SALVADOR et al., 1998). No Brasil, a circulação do vírus já foi demonstrada em vários Estados como o Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (COLODEL et al., 2002; SALVADOR et al., 1998; GOMES et al., 2002; WEIBLEN et al., 1989; SOUZA et al., 2002). Entretanto, a sua real prevalência permanece desconhecida, pelo fato do vírus apresentar grande reatividade sorológica com o BoHV-1 (RISSI et al., 2007).

Os alfa herpesvírus possuem aproximadamente 70 genes (DELHON et al., 2003), os quais codificam produtos como enzimas, glicoproteínas, proteínas regulatórias e estruturais. No envelope viral, estão presentes mais de dez glicoproteínas, que desempenham importante papel na biologia do vírus, pela mediação da entrada dos vírions nas células hospedeiras, fusão e disseminação célula a célula (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996; METTENLEITER, 2003). Deleções de alguns genes tem sido realizadas para o entendimento da função de algumas glicoproteínas na replicação viral *in vitro* e *in vivo* (ENQUIST et al., 1998, METTENLEITER, 2003), e também com o intuito de atenuar alfa herpesvírus de interesse veterinário, possibilitando a utilização destes vírus recombinantes na produção de vacinas atenuadas diferenciais (FLORES et al., 1993). Os genes mais frequentemente deletados são os que codificam a glicoproteína de envelope E (gE), glicoproteína I (gI), glicoproteína C (gC), proteína US9 e a enzima timidina quinase (TK), em deleções únicas ou duplas (FLORES et al., 1993; KAASHOEK et al., 1994; 1996; BELKNAP et al., 1999).

As vacinas atenuadas diferenciais induzem uma resposta sorológica que pode ser diferenciada da resposta em animais infectados naturalmente (VAN OIRSCHOT et al., 1996). Este tipo de vacina é bastante eficiente em programas de controle e erradicação de

alfaherpesvírus. Os genes a serem deletados devem estar relacionados a proteínas que sejam conservadas, imunogênicas e não-essenciais *in vitro* e *in vivo* (KAASHOEK et al., 1995), sendo as glicoproteínas os principais candidatos à deleção.

A gE tem sido alvo de escolha para deleções em alfaherpesvírus por apresentar as características necessárias, pois é uma glicoproteína não-essencial na replicação viral em cultivo celular e é conservada entre isolados de campo (ENQUIST et al., 1998). Outra importância da gE está relacionada a funções de neuroinvasividade e neurovirulência do BoHV-5, sendo responsável pelo transporte anterógrado a partir da mucosa olfatória e para a infecção eficiente dos neurônios de segunda e terceira ordem (CHOWDHURY et al., 2000). Dessa forma, a sua deleção em diferentes alfaherpesvírus como o herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o vírus da doença de Aujeszky (PRV) (MULDER et al., 1994; DINGWELL et al., 1995), tem demonstrado que os vírus defectivos mantêm a capacidade de infectar o SNC, porém com significativa redução da replicação e disseminação viral (CHOWDHURY et al., 2000). Na ausência da gE, as vesículas contendo as glicoproteínas não seriam transportadas ao longo dos axônios, não ocorrendo a maturação final dos vírus junto à sinapse e a sua transmissão trans-sináptica (TOMISHIMA; ENQUIST, 2001; SNYDER et al., 2008), contribuindo para a atenuação do vírus.

No entanto, alguns estudos indicam que a simples deleção da gE no BoHV-1 e BoHV-5 não promove uma atenuação completa e satisfatória para o uso em vacinas (KAASHOEK et al., 1998; CHOWDHURY et al., 2000). Assim, é necessária a deleção de outro gene que promova atenuação. A deleção do gene da TK já demonstrou ser efetivo, uma vez que a completa virulência do BoHV-5 depende da sua função (CHOWDHURY, 1996). A TK é uma enzima que está presente em todos os alfaherpesvírus, e está envolvida no metabolismo dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs), que são necessários para a síntese do DNA viral e replicação do genoma em células que não a expressam constitutivamente, como os neurônios (TIKOO et al., 1995; ENQUIST et al., 1998), sendo necessária para a completa virulência do BoHV-5 *in vivo*. A deleção da TK em outros alfaherpesvírus tem sido associada à diminuição da neurovirulência pela redução da replicação nos neurônios (FERRARI et al., 2000, CHEN et al., 2004). Cepas defectivas do PRV, HSV-1 e BoHV-1 no gene da TK foram capazes de infectar neurônios e estabelecer infecção latente, porém, apresentaram reduzida habilidade de reativá-la (FERRARI et al., 2000; CHEN et al., 2004; WHETSTONE et al., 1992). A implicação da deleção da enzima TK na neurovirulência do BoHV-5 ainda não foi demonstrada em bovinos, mas em coelhos essa deleção ocasionou uma redução drástica nos sinais neurológicos (SILVA et al., 2010).

Cepas defectivas nos genes da gE e da TK aparentemente matêm a sua capacidade de estabelecer latência (CHOWDHURY et al., 2000; LIU et al, 2008). Porém, a administração de corticóides na tentativa de reativação de animais inoculados com cepas de BoHV-1 com deleção da gE tem demonstrado dificuldades de detectar excreção viral e sinais clínicos (KAASHOEK et al., 1998). Um estudo com BoHV-1 em coelhos, demonstrou que a reativação de cepas defectivas na gE não foi seguida do transporte anterógrado do vírus a mucosa ocular e nasal (LIU et al., 2008). Da mesma forma, BoHV-1 defectivos na TK demonstraram ineficiência na replicação viral, entretanto podem estabelecer latência e reativar após infecção latente (WHESTONE et al., 1992).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a patogenia da infecção por recombinantes do BoHV-5 defectivos nos genes da gE, TK e ambos, em bezerros. Foram abordados os aspectos clínicos e virológicos durante a infecção aguda e latente, assim como uma investigação do DNA viral latente no encéfalo dos animais infectados.

2 CAPÍTULO 1

Infecção experimental de bezerros com recombinantes dos herpesvírus bovino tipo 5 defectivos nos genes da glicoproteína E, timidina quinase ou ambos

Cyndia M. B. dos Santos¹, Deniz Anziliero¹, Fernando V. Bauermann¹, Mário C. S. Brum²,
Rudi Weiblen¹ e Eduardo Furtado Flores^{1*}

(Artigo a ser submetido para publicação – Pesquisa Veterinária Brasileira)

¹ Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, BR 472, Km 592, Caixa Postal 118. Curso de Medicina Veterinária, Hospital Veterinário 97500-970 – Uruguaiiana, RS – Brasil, Telefone: (55) 34134321.

* Autor para correspondência: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, CEP 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034. E-mail: flores@ccr.ufsm.br.

ABSTRACT.- Santos, C.M.B., Anziliero, D., Bauermann, F.V., Brum, M.C.S., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2010. [**Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E, thymidine kinase or both**]. Infecção experimental de bezerros com recombinantes do herpesvírus bovino tipo 5 defectivos nos genes da glicoproteína E, timidina quinase ou ambos. Pesquisa Veterinária Brasileira. Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: flores@ccr.ufsm.br

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is the etiologic agent of neurological disease in cattle. The use of recombinant differential vaccines have been proposed against the disease. This dissertation describes an investigation on the attenuation in calves of three BoHV-5 recombinants with deletions in the coding regions of glycoprotein E (BoHV-5gE Δ), thymidine kinase (BoHV-5TK Δ) and (BoHV-5gETK Δ) for potential use in vaccines. Each of the four groups of calves was inoculated intranasally with one of the mutants or the wild type virus (wt [SV507/99]) and monitored thereafter. The calves inoculated with wt virus shed virus for an average of 12.3 days ($10^{6.8}$ TCID₅₀/mL), in the group BoHV-5gE Δ for 11 days ($10^{5.1}$ TCID₅₀/mL), in the group BoHV-5TK Δ for 9.6 ($10^{5.9}$ TCID₅₀/mL) and in the group BoHV-5gETK Δ for 6.2 days ($10^{4.7}$ TCID₅₀/mL). No respiratory or systemic signals were observed in animals inoculated with the recombinants, while two calves of the wt group presented neurologic disease and were euthanized *in extremis*. Seroconversion was verified on the 32 days post-inoculation (pi) in all animals of group wt and BoHV-5gE Δ , while 2 and 4 animals of the groups BoHV-5TK Δ e BoHV-5gETK Δ seroconverted, respectively. Aiming at reactivating latent infection, on the 42 days pi, animals were treated with dexamethasone (Dx). Reactivation was achieved in wt group while groups BoHV-5gE and BoHV-5TK Δ shed virus only for one or two days. No virus shedding was verified on group BoHV-5gETK Δ . Euthanasia was executed 30 days later and brain sections were collected for DNA viral detection. Viral DNA was detected in the brain of wt inoculated animals and in restricted brain sections in the BoHV-5gE Δ group. These results demonstrated that mutants are fully attenuated for calves during acute infection and present a reduced ability to establish and/or reactivate latent infection after Dx administration. Therefore, these recombinants may be useful in vaccines formulations.

INDEX TERMS: BoHV-5, virulence, vaccine, recombinants

RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente de doença neurológica grave em bovinos. A utilização de vacinas recombinantes tem sido preconizada para o controle da infecção pelo BoHV-5. O objetivo do presente trabalho foi investigar a patogenia, em bezerros, de três recombinantes do BoHV-5, com deleções nos genes da glicoproteína E (BoHV-5gEΔ), da enzima timidina quinase (BoHV-5TKΔ) e ambos (BoHV-5gETKΔ) para uso potencial em vacinas. Para isso, quatro grupos de bezerros com 80 a 90 dias de idade foram inoculados pela via intranasal (IN) com um dos recombinantes ou com a cepa parental (SV507/99) e monitorados nos dias seguintes à inoculação. Os animais inoculados com o vírus parental (SV507/99) excretaram vírus por um período médio de 12,3 dias (título máximo $10^{6,8}$ DICC₅₀.mL), no grupo BoHV-5gEΔ por 11 dias ($10^{5,1}$ DICC₅₀.mL), no grupo BoHV-5TKΔ por 9,6 dias ($10^{5,9}$ DICC₅₀.mL) e no grupo BoHV-5gETKΔ por 6,2 dias ($10^{4,7}$ DICC₅₀.mL). Os animais inoculados com os vírus recombinantes não desenvolveram sinais respiratórios ou sistêmicos importantes; dois animais do grupo SV507/99 apresentaram doença neurológica e foram sacrificados *in extremis*. No dia 32 pós-inoculação (pi) os animais inoculados com o SV507/99 e BoHV-5gEΔ haviam soroconvertido (títulos de 4 a 8), enquanto nos grupos BoHV-5TKΔ e BoHV-5gETKΔ, 2 e 4 animais soroconverteram (títulos de 2 a 8), respectivamente. No dia 42 pi realizou-se a administração de dexametasona (Dx) na tentativa de reativar a infecção latente. Após a administração de Dx, os animais dos grupos BoHV-5gEΔ e BoHV-5TKΔ excretaram vírus por um ou dois dias. Os animais do grupo BoHV-5gETKΔ não excretaram vírus, enquanto a excreção pelos animais do grupo inoculado com o vírus parental foi mais duradoura e em maiores títulos. No dia 30 pós-Dx os animais foram submetidos a eutanásia para a coleta do encéfalo para a pesquisa de DNA latente por PCR. Não foi detectado DNA viral no encéfalo dos animais inoculados com o BoHV-5TKΔ e BoHV-5gETKΔ, enquanto no grupo SV507/99 foi detectado em todos os animais nas diferentes secções. Dentre os animais inoculados com o recombinante BoHV-5gEΔ, foi verificada uma distribuição de DNA viral restrita, com detecção em apenas uma secção (córtex anterior, ponte ou tálamo) de três animais. Esses resultados demonstram que os recombinantes foram atenuados durante a infecção aguda; apresentaram uma capacidade reduzida de estabelecer infecção latente e não foram facilmente reativados pela administração de Dx. Com isso, constituem-se em potenciais candidatos a cepas vacinais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BoHV-5, virulência, vacina, recombinantes

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pertence a família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. É um vírus DNA de fita dupla linear, envelopado e com capsídeo icosaédrico. O BoHV-5 era previamente considerado um subtipo do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), denominado BoHV-1.3 (Roizman et al. 1992). O BoHV-1 e BoHV-5 apresentam grandes semelhanças antigênicas, estruturais e moleculares, além de uma extensa reatividade sorológica cruzada. Entretanto, estes vírus diferem na sua habilidade de invadir o sistema nervoso central (SNC) e causar doença neurológica (Metzler et al. 1986, Belknap et al. 1994, Ashbaugh et al. 1997). Embora o BoHV-1 tenha sido ocasionalmente identificado em casos de meningoencefalite, a maioria dos casos de doença neurológica estão associados com o BoHV-5 (Silva et al. 2007)

A enfermidade neurológica associada ao BoHV-5 tem sido descrita em vários países, com maior frequência no Brasil e Argentina (Carrillo et al. 1983, Salvador et al. 1998). A infecção natural e experimental de bovinos jovens com BoHV-5 resulta na invasão e replicação viral no sistema nervoso central (SNC). Os sinais da doença neurológica incluem depressão, tremores, bruxismo, salivação, cegueira, protusão da língua, opistótono, ataxia e convulsões (Carrillo et al. 1983, Perez et al. 2002).

Os alfa herpesvírus possuem mais de dez glicoproteínas no envelope, que desempenham importante papel no ciclo replicativo viral, pela mediação da penetração dos vírions nas células hospedeiras, fusão e disseminação entre células (Schwyzer & Ackermann 1996, Mettenleiter 2003). Deleções de genes têm sido realizadas para o estudo da função de produtos gênicos na replicação viral (Enquist et al. 1998, Mettenleiter 2003), para atenuar alfa herpesvírus de interesse veterinário e para a produção de cepas vacinais com marcadores antigênicos (Van Oirschot 1999).

A glicoproteína E (gE) tem demonstrado as qualidades necessárias para deleção, tanto com vistas à atenuação, quanto como marcador antigênico (Chowdhury et al. 2000). A gE é importante para a invasão e disseminação viral do BoHV-5 no SNC, sendo responsável pelo transporte anterógrado a partir da mucosa olfatória e para a eficiente infecção dos neurônios de segunda e terceira ordens (Chowdhury et al. 2000). Entretanto, a simples deleção na gE no BoHV-1 e BoHV-5 não promove atenuação suficiente para o uso em vacinas (Kaashoek et al. 1998, Chowdhury et al. 2000), sendo necessária a deleção adicional de outro gene. A deleção do gene da timidina quinase (TK) já demonstrou ser adequada para atenuação, uma vez que a

enzima TK é necessária para a replicação dos alfa herpesvírus em neurônios e, assim para a expressão da neurovirulência (Kaashoek et al. 1996, Ferrari et al. 2000, Chen et al. 2004).

Com o intuito de produzir uma vacina diferencial atenuada, cepas recombinantes com deleções nos genes da gE, TK e deleção dupla (gETK Δ) foram produzidas a partir do isolado SV507/99 do BoHV-5 por Brum et al. (2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar a virulência e patogenicidade dos três recombinantes em bezerros.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Vinte e um bezerros divididos em quatro grupos foram inoculados por via intranasal (IN) com cada um dos recombinantes (BoHV-5gE Δ [n=5]; BoHV-5TK Δ [n=5] e BoHV-5gETK Δ [n=6]) ou com o vírus parental (SV507/99[n=5]). Os animais foram monitorados nos aspectos clínicos, virológicos e sorológicos nos 15 dias seguintes à inoculação. No dia 42 pós-inoculação (pi), os animais foram submetidos à administração de dexametasona (Dx) na tentativa de reativar a infecção latente, e foram monitorados durante os 15 dias seguintes. No dia 30 pós-Dx os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta do encéfalo para a pesquisa de DNA viral latente.

Células e vírus

As técnicas de multiplicação, quantificação, isolamento viral e soro-neutralização (SN) foram realizadas em células de linhagem de rim bovino CRIB (Flores & Donis 1995). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6mg/mL), estreptomicina (0,4mg/mL), nistatina (0,002mg/mL), fungizona (0,0025mg/mL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A cepa parental do BoHV-5 utilizada foi a SV507/99, isolada de um surto de meningoencefalite no sul do Brasil (Delhon et al. 2003). Os vírus com as deleções nos genes da gE, TK ou ambas foram produzidos pela técnica de recombinação homóloga a partir da cepa SV507/99, e caracterizados anteriormente (Brum et al. 2010).

Animais, inoculação viral e monitoramento da infecção aguda

Vinte e um bezerros machos das raças Jersey e Holandesa, com aproximadamente 3 meses de idade e 80kg de peso corporal médio foram aleatoriamente alocados em quatro

grupos de cinco e seis animais e alimentados *ad libitum*. Durante o experimento os grupos foram mantidos separados para evitar contato. Os animais foram inoculados pela via IN com 2mL do sobrenadante de cultivo de células CRIB infectadas com cada uma das cepas virais deletadas, ou do vírus parental. O inóculo continha $10^{7,5}$ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀). Após a inoculação, os animais foram monitorados clinicamente durante 15 dias. O monitoramento virológico foi realizado pela coleta de secreções nasais com suabes, seguida de tentativas de isolamento viral entre os dias 0 e 15 pós-inoculação (pi) (Vogel et al. 2003). O monitoramento sorológico foi realizado pela coleta de soro nos dias 0, 14, 28 e 32 pi. As amostras foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes pela técnica de soroneutralização (SN) conforme Diel et al. (2007), contra o vírus homólogo de cada grupo.

Administração da dexametasona (Dx) e monitoramento

Quarenta e dois dias após a inoculação, os animais foram submetidos à administração de dexametasona (Decadronal[®]) na dose de 1,5mg/kg/dia por via intramuscular (IM) durante 5 dias, na tentativa de reativar a infecção latente. Após a administração de Dx, os animais foram submetidos a monitoramento clínico e virológico de acordo com a infecção aguda. Para o monitoramento sorológico, foram coletadas e testadas amostras de soro nos dias 0, 14 e 30 pós-Dx.

Distribuição do DNA viral latente no encéfalo

No dia 30 pós-Dx, os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta de secções do encéfalo. Foram coletadas individualmente as seguintes secções: bulbo olfatório (BO), córtex anterior (CA) e ventro-lateral (CVL), gânglios trigêmeos (TG), ponte (PO) e tálamo (TAL). Os tecidos foram macerados e submetidos à extração de DNA total conforme descrito por Vogel et al. (2003). Em seguida, o DNA foi eluído em tampão Tris-EDTA (0,5mL) e estocado a -20°C. A detecção de DNA viral foi realizada pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) *nested*, utilizando-se *primers* que amplificam um segmento do gene da glicoproteína B (gB) do BoHV-5 (Diel et al. 2007).

RESULTADOS

Infecção aguda

Os animais inoculados com os vírus recombinantes apresentaram somente apatia transitória, leve descarga serosa nasal e ocular transitória. A temperatura corpórea nos animais dos diferentes grupos não apresentou alteração (dados não apresentados). Os animais do grupo inoculado com a cepa parental SV507/99 apresentaram apatia profunda, anorexia seguida de perda da condição corporal e enfraquecimento. Dois animais deste grupo (350 e 348) apresentaram sinais neurológicos, como apatia profunda, sendo submetidos à eutanásia *in extremis* nos dias 10 e 11 pi, respectivamente.

Todos os animais inoculados excretaram o vírus nos dias seguintes à inoculação. A duração média da excreção viral foi: grupo SV507/99 ($12,3 \pm 0,5$ dias); BoHV-5gEA ($11 \pm 1,6$ dias); BoHV-5TKΔ ($9,6 \pm 1,1$ dias) e BoHV-5gETKΔ ($6,2 \pm 0,4$ dias). A excreção viral por alguns animais ocorreu de forma intermitente (Quadro 1). Os títulos máximos observados entre os dias 1 e 6 pi foram de $10^{6,8}$ DICC₅₀/mL no grupo SV507/99, $10^{5,1}$ DICC₅₀/mL no grupo BoHV-5gEA, $10^{5,9}$ DICC₅₀/mL no grupo BoHV-5TKΔ e $10^{4,7}$ DICC₅₀/mL no grupo BoHV-5gETKΔ. As médias dos títulos virais de cada grupo durante a infecção aguda estão representadas na Fig.1.

Todos os animais dos grupos SV507/99 e BoHV-5gEA soroconverteram, desenvolvendo títulos de anticorpos neutralizantes entre 4 e 32 no dia 32 pi, sendo que os animais inoculados com a cepa parental apresentaram títulos maiores (Quadro 1). Três bezerros (95, 327 e 4322) do grupo BoHV-5TKΔ e dois (3276 e 3280) do grupo BoHV-5gETKΔ não soroconverteram em títulos detectáveis (igual ou <2) até o dia 32 pi quando submetidos a soroneutralização com uma concentração viral de 200 DICC₅₀.mL. Entretanto quando essa dose era reduzida a 100 DICC₅₀.mL esses animais demonstraram que haviam soroconvertido (Quadro 1).

Infecção latente

Suabes nasais coletados no dia da administração de Dx foram negativos no isolamento viral, demonstrando que os animais estavam em infecção latente. Após a administração de Dx, três animais do grupo SV507/99 excretaram o vírus entre os dias 8 e 12, de forma intermitente (Quadro 1). Dentre os animais do grupo inoculado com o recombinante BoHV-5gEA, dois animais excretaram vírus por um ou dois dias (9 e 10 pós-Dx). Nos animais do grupo BoHV-5TKΔ, a excreção viral foi detectada em três animais entre os dias 8 e 10 pós-Dx. No grupo BoHV-5gETKΔ o vírus não foi isolado das secreções de nenhum animal. Os títulos virais excretados após o tratamento com Dx foram inferiores aos da infecção aguda (dados não apresentados). O animal 4325 do grupo SV507/99 apresentou um título de 128 no

dia 30 pós-Dx, sendo o único do grupo a apresentar aumento de títulos na SN, superior a quatro vezes.

Após a tentativa de reativação, os animais 247 (BoHV-5TKΔ), 3276 e 3278 (BoHV-5gETKΔ) foram submetidos a eutanásia *in extremis* nos dias 3, 8 e 10 pós-Dx respectivamente, devido a causas não-relacionadas.

Distribuição do DNA viral no encéfalo

As secções do SNC foram coletadas 30 dias após a administração de Dx, quando todos os animais estavam em infecção latente. Em todos os animais do grupo SV507/99 foi detectado DNA viral em todas as secções do encéfalo testadas. No grupo BoHV-5gEΔ, somente foi detectado DNA viral nas secções do córtex anterior, tálamo e ponte, nos animais 42, 363 e 3294, respectivamente. Nos animais dos grupos inoculados com os recombinantes BoHV-5TKΔ e BoHV-5gETKΔ, não foi possível detectar DNA viral nas secções coletadas (Quadro 2).

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a patogenia da infecção por três vírus recombinantes do BoHV-5, com deleções nos genes da gE, TK ou ambas, em bezerros. Os recombinantes foram construídos a partir da cepa parental SV507/99 com o objetivo de se obter cepas para uso em vacinas (Brum et al. 2010). A deleção da gE foi introduzida no genoma como marcador antigenico a deleção da TK teve como objetivo a atenuação da cepa parental. A partir de recombinantes com deleções únicas foi construído o recombinante com dupla deleção (Brum et al. 2010). A patogenia da cepa parental SV507/99 já foi amplamente estudada em bovinos (Vogel et al. 2003), em coelhos (revisado por Flores et al. 2009) e em caprinos (Diel et al. 2007). A patogenia dos recombinantes foi recentemente estudada em coelhos (Silva et al. 2010). O presente estudo demonstrou que as três cepas recombinantes são atenuadas para bezerros de 80-90 dias de idade, ao contrário da cepa parental que demonstrou ser neurovirulenta. A atenuação do duplo mutante para bezerros após inoculação intramuscular também foi recentemente demonstrada (Anziliero 2010). Além disso, pela tentativa de isolamento viral após o tratamento com dexametasona, pode-se concluir que as cepas recombinantes são deficientes no estabelecimento e/ou na reativação da latência, característica altamente desejável em cepas para uso vacinal.

A patogenia da doença neurológica causada pelo BoHV-5 tem sido alvo de estudos. A replicação do BoHV-5 na mucosa nasal é seguida da invasão, replicação e disseminação no SNC (Lee et al. 1999, Vogel et al. 2003). Neste processo estão envolvidas diversas proteínas que contribuem tanto para a neuroinvasividade quanto para a neurovirulência. A deleção dos genes das proteínas gE e TK podem resultar em uma incapacidade do vírus em invadir o SNC e causar doença (Enquist et al. 1998). A gE tem como função a disseminação viral entre neurônios, entretanto, somente a sua deleção não é suficiente para atenuar o vírus (Kaashoek et al. 1995). Estudos com o vírus da pseudorraiva (PRV) *in vivo*, demonstram que a deleção da gE impede a transmissão transneuronal pelas rotas trigeminal e parassimpática, embora a entrada e replicação primária nos sítios primários sejam pouco reduzidas (Kritas et al. 1994). Apesar de demonstrada a capacidade de replicar na mucosa nasal, o recombinante BoHV-5gEΔ do presente trabalho não produziu doença neurológica. Contudo, os animais desse grupo foram os únicos inoculados com os vírus mutantes em que se detectou DNA viral no SNC durante a infecção latente. Porém, demonstrou-se que a sua distribuição no SNC foi restrita quando comparada ao grupo dos animais inoculados com o SV507/99, sendo recuperado DNA viral apenas de três secções de animais diferentes, sugerindo que a quantidade de DNA latente era insuficiente para a detecção. Em um trabalho recente, Silva et al. (2010) demonstraram que o BoHV-5gEΔ apresenta uma neurovirulência residual em coelhos, com uma replicação eficiente na mucosa nasal, causando doença em 37,5% (3/8) dos animais. Anteriormente já havia sido demonstrado que a deleção única da gE pode não ser suficiente para a atenuação do BoHV-1 e BoHV-5 (Kaashoek et al. 1996, Chowdhury et al. 2000). Entretanto, outros experimentos sugeriram que recombinantes do BoHV-1 contendo a deleção no gene da gE foram avirulentos para bovinos (Van Engelenburg et al. 1994). Os resultados do presente trabalho indicam que o recombinante BoHV-5gEΔ é bem atenuado para bezerros após administração IN, não produzindo manifestações clínicas durante a infecção aguda. Não obstante, foi excretado por mais tempo do que o recombinante defectivo na TK e que o duplo mutante. Essa duração da replicação e excreção indica que a deleção na gE resulta em atenuação de menor magnitude do que a deleção na TK, tomando-se a replicação na mucosa nasal como indicador.

No presente experimento, durante a infecção aguda, o tempo de excreção viral e a quantidade de vírus excretada foram inferiores nos grupos dos recombinantes, quando comparados aos animais do grupo SV507/99, semelhante ao trabalho de Kaashoek et al. (1995). Após a tentativa de reativação da infecção latente, somente foi recuperado vírus na secreção nasal de apenas dois animais, demonstrando certa deficiência na reativação. Outros

estudos com BoHV-1 também demonstraram que a simples deleção da gE pode atenuar o vírus (Van Engelenburg et al. 1994).

A enzima TK tem sido estudada em diferentes alfa herpesvírus, mas pouco se sabe sobre o seu papel na neuropatogênese da infecção pelo BoHV-5. A TK está relacionada com a síntese de nucleotídeos necessários na duplicação do DNA viral durante sua replicação em neurônios (Chowdhury 1996). Cepas defectivas do PRV, HSV-1 (herpes simplex tipo 1) e BoHV-1 no gene da TK foram capazes de infectar neurônios e estabelecer infecção latente, porém, apresentam reduzida habilidade de reativa-lá (Ferrari et al. 2000, Wheststone et al. 1992, Chowdhury 1996) No presente estudo, o vírus recombinante BoHV-5TK Δ apresentou tempo e frequência de excreção viral reduzidos durante a infecção aguda. Da mesma forma, não induziu sinais clínicos. Todas as secções do encéfalo testados para a presença de DNA viral foram negativas. Sugere-se, assim, que o BoHV-5TK Δ foi incapaz de estabelecer uma infecção latente eficiente, provavelmente devido a sua reduzida capacidade de replicar em neurônios. Estudos com BoHV-1 defectivos na TK demonstraram ineficiência na replicação viral, entretanto podem estabelecer latência e reativar após infecção latente (Whestone et al. 1992). Silva et al. (2010) demonstraram que esse mutante quando inoculado em coelhos, não foi capaz de provocar sinais neurológicos, dessa forma demonstrando a atenuação desse recombinante.

O BoHV-5gETK Δ demonstrou ser o recombinante mais atenuado. A replicação viral na mucosa nasal dos animais durante a infecção aguda foi muito reduzida, pelo menor tempo e título de excreção viral entre os grupos. Estudos anteriores em coelhos de Silva et al. (2010), também haviam demonstrado atenuação completa do BoHV-5gETK Δ . Além disso, não houve detecção viral na tentativa de reativação com a administração de Dx. Essa falha em reativar provavelmente se deva a essa dupla deleção determinar um maior efeito deletério ao vírus, entretanto não perdendo a capacidade de replicar na mucosa e induzir resposta sorológica. Também não detectou-se DNA viral em nenhuma das secções do SNC, sugerindo que esses vírus são incapazes de estabelecer a infecção latente eficiente e portanto de reativá-la. Todos os seis animais soroconverteram até o dia 30 pós-Dx, mas com títulos inferiores aos animais do grupo parental. Não obstante, esse vírus quando inoculado por via intramuscular em bezerros produziu boa resposta sorológica e protegeu os animais após o desafio por BoHV-5 (Anziliero et al. 2010). Assim como o trabalho de Kaashoek et al. (1996) com recombinantes do BoHV-1, a dupla deleção tornou o vírus mais atenuado, viabilizando a sua utilização em formulações vacinais.

Os resultados obtidos nesse experimento concluem que os três vírus recombinantes são atenuados em bovinos em diferentes graus quando inoculados por via intranasal. Nenhum dos mutantes foi capaz de promover o desenvolvimento de sinais neurológicos durante a infecção aguda em bovinos. Todos os animais inoculados com os vírus recombinantes tiveram o tempo de excreção e título viral excretado reduzidos. Os recombinantes com única deleção reativaram a infecção latente em menor magnitude quando comparados ao vírus parental. O recombinante com a dupla deleção demonstrou ser o mais atenuado, uma vez que não houve a reativação dos animais inoculados com esse mutante. Todos os animais soroconverteram, demonstrando a capacidade desses vírus em induzir uma resposta de anticorpos. Contudo, o recombinante indicado para o uso em formulações vacinais atenuadas é o BoHV-5gETKΔ, pois apresenta marcador sorológico e não reativou a infecção latente.

REFERÊNCIAS

- Anziliero, D., Santos, C.M.B., Bauermann, F.V., Brum, M.C.S., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2010. Imunogenicidade de uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 5 defectiva na glicoproteína E e enzima timidina quinase (manuscrito em preparação).
- Ashbaugh, S. E., Thompson, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S. & Collins, J.K. 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:387-394.
- Belknap, E.B., Collins, J.K., Ayers, V.K. & Schultheiss, P.C. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Path.* 31:358-365.
- Brum, M. C., Weiblen, R., Flores, E.F. & Chowdhury, S.I. 2010. Construction and growth properties of bovine herpesvirus type 5 recombinants defective in the glycoprotein E or thymidine kinase gene or both. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43:217-224.
- Carrillo, B.J., Pospischil, A. & Dahme, E. 1983. Pathology of bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.* 30:161-168.
- Chen, S. H., Peason, A. & Coen, D.M. 2004. Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. *J. Virol.* 78:520-523.
- Chowdhury, S. I. 1996. Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. *Vet. Microbiol.* 52:13-23.
- Chowdhury, S. I., Lee, B.J., Ozkul A. & Weiss, M.L. 2000. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 74:2094-2106.

- Diel, D. G., Almeida, S.R., Brum M.C.S., Dezengrini, R., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2007. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 121:257-267.
- Enquist, L. W., Husak, P.J., Banfield, B.W. & Smith, G.A. 1998. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.* 51:237-347.
- Ferrari, M., Mettenleiter, T.C., Romanelli, M.G., Cabassi, E., Corradi, A., Dal Mas, N. & Silini, R. 2000. A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *J. Comp. Pathol.* 123:152-163.
- Flores, E.F. & Donis, R.O. 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection due to a block in viral entry. *Virol.* 208:565-575.
- Flores, E.F., Weiblen R., Vogel, F.S.F., Dezengrini, R., Almeida, S.R., Spilki, F.R. & Roehe, P.M. 2009. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 29:1-16.
- Kaashoek, M. J., Moerman, A., Madie, J., Weerdmeester, K., Maris-Veldhuis, M., Rijsewijk, F.A. & van Oirschot, J.T. 1995. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine.* 13:342-346.
- Kaashoek, M.J., van Engelenburg F.A.C., Moerman, A., Gielkens, A.L.J., Rijsewijk, F.A.M. & van Oirschot, J.T. 1996. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet. Microbiol.* 48:143- 153.
- Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F.A., Ruuls, R.C., Keil, G.M., Thiry, E., Pastoret, P.P. & van Oirschot, J.T. 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine.* 16:802-809.
- Kritas, S. K., Pensaert, M.B. & Mettenleiter, T.C. 1994. Invasion and spread of single glycoprotein deleted mutants of Aujeszky's disease virus (ADV) in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation. *Vet. Microbiol.* 40:323-334.
- Lee, B. J., Weiss, M.L., Mosier, D. & Chowdhury, S.I. 1999. Spread of herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J. Neurovirol.* 5:474-484.
- Mettenleiter, T. C. 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res.* 92:197-206.
- Metzler, A. E., Schudel, A.A. & Engels, M. 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.* 87:205-217.
- Perez, S. E., Bretschneider, G., Leunda, M.R., Osório, F.A., Flores, E.F. & Odeón, A.C. 2002. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.* 39:437-444.

- Roizman, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C. & Minson, A.C. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123:425-449.
- Salvador, S. C., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Roehe, P.M. & Osório, A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18:76-83.
- Schwyzer, M. & Ackermann, M. 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 53:17-29.
- Silva, M. S., Brum, M.C.S., Loreto, E.L.S., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2007. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.* 129:191-199.
- Silva, S. C., Brum, M.C.S., Weiblen, R., Flores, E.F. & Chowdhury, S.I. 2010. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43:150-159.
- Van Engelenburg, F.A.C., Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A.M., Van den Burg, L., Moerman, A., Gielkens, A.L.J. & van Oirschot, J.T. 1994. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J. Gen. Virol.* 75:2311-2318.
- Van Oirschot, J. T. 1999. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J. Biotechnol.* 73: 195-205.
- Vogel, F.S.F, Caron, L., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Mayer, S.V. & Bastos, R.G. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41:4512-4520.
- Whetstone, C. A., Miller, J.M., Seal, B.S., Bello, L.J. & Lawrence, W.C. 1992. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch. Virol.* 122:207-214.

Quadro 1- Excreção viral e sorologia durante a infecção aguda e latente em bezerros inoculados com recombinantes e a cepa parental do BoHV-5.

Grupos e nº do animal	Infecção Aguda		Infecção latente		
	Excreção viral ^a (dias)	Título de Ac ^b (dia 32 pi)	Título de Ac (dia 0 pós-Dx)	Excreção viral (dias)	Título de Ac (dia 30 pós-Dx)
SV-507/99					
348	1-10	NT ^c	NT	NT	NT
349	1-13	16	16	8-12	32
350	1-9	NT	NT	NT	NT
381	1-7, 9-12* ^d	32	32	10-11	32
4325	1-12	16	16	8-11	128
	Média 12,3				
gEΔ					
42	1-7,10*	4	8	-	16
99	1-12	8	8	9	4
363	1-7,10,11,13*	8	4	9	8
3283	1-6, 8, 10, 11*	4	8	-	8
3294	1-6,8- 9*	4	8	-	4
	Média 11				
TKΔ					
95	1-9	<2	<2	-	16
247	1-9, 11*	<2	<2	-	NT
327	1-5, 7, 8*	4	4	8, 10	4
372	1-6, 8-10*	<2	8	8, 10	4
4322	1-10	8	64	8, 10	8
	Média 9,6				
gETKΔ					
44	1-6	4	4	-	2
45	1-7	4	4	-	4
3276	1-6	<2 - (4 ^e)	<2	-	2 ^f
3278	1-6	4	2	-	4 ^f
3280	1-6	<2 - (4 ^e)	<2	-	2
4324	1-6	2 - (4 ^e)	4	-	4
	Média 6,2				

^a Período de excreção viral nas secreções nasais;

^b Títulos expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de prevenir a replicação viral na técnica de soroneutralização utilizando uma concentração viral de 200 DICC₅₀;

^c Não testados;

^d Excreção viral intermitente;

^e Títulos expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de prevenir a replicação viral na técnica de soroneutralização utilizando uma concentração viral de 100 DICC₅₀;

^f Títulos de anticorpos testados referentes ao dia 7 pós- Dx;

Quadro 2- Detecção do DNA viral por PCR durante a infecção latente no encéfalo dos bezerros inoculados com os recombinantes e a cepa parental do BoHV-5.

Grupo	Animal	Secções do encéfalo ^a						Positivos / Total
		BO	CA	CVL	TG	PO	TAL	
SV-507/99	349	+ ^b	+	+	+	+	+	(6/6)
	381	+	+	+	+	-	+	(5/6)
	4325	+	- ^c	+	+	-	+	(4/6)
gEΔ	42	-	+	-	-	-	-	(1/6)
	99	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	363	-	-	-	-	-	+	(1/6)
	3283	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	3294	-	-	-	-	+	-	(1/6)
TKΔ	95	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	327	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	372	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	4322	-	-	-	-	-	-	(0/6)
gETKΔ	44	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	45	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	3280	-	-	-	-	-	-	(0/6)
	4324	-	-	-	-	-	-	(0/6)

^a BO: bulbo olfatório; CA: córtex anterior; CVL: córtex ventro-lateral; TG: gânglio trigêmeo; PO: ponte; TAL: tálamo.

^b Presença de DNA viral;

^c Ausência de DNA viral;

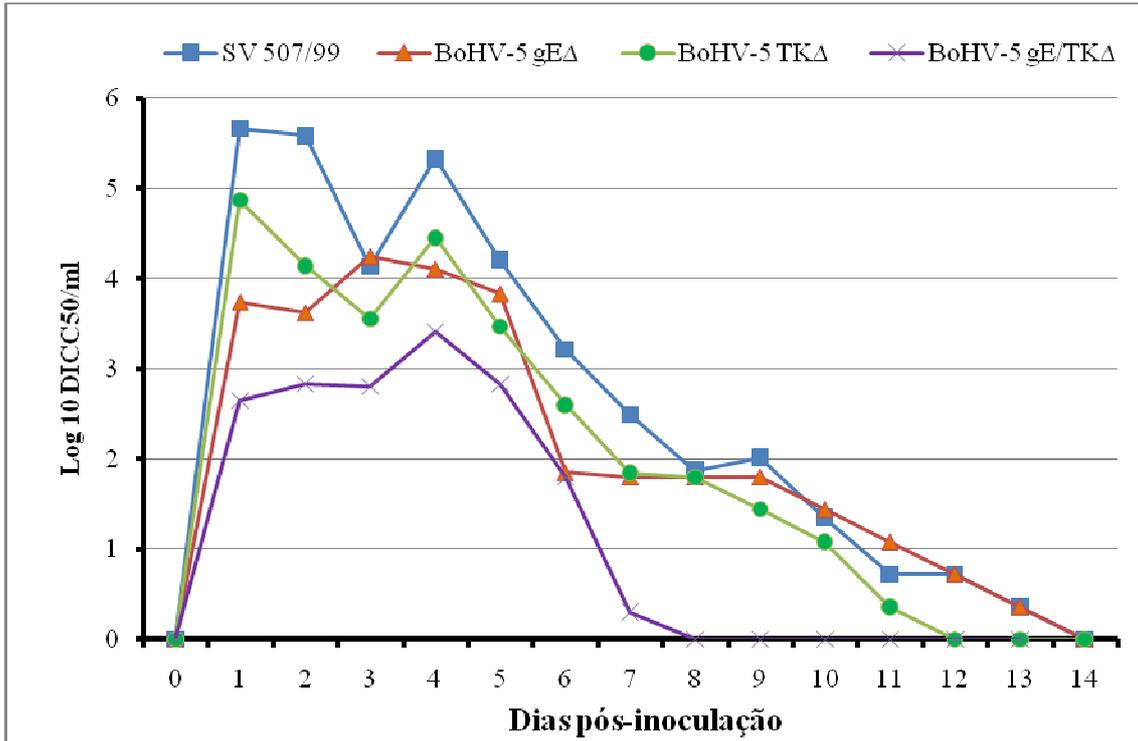


Fig. 1. Excreção viral nas secreções nasais durante os 14 dias pós-inoculação. As médias diárias dos títulos virais estão expressas em \log_{10} DICC₅₀/ml (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares).

3 REFERÊNCIAS

ASHBAUGH, S. E. et al. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 9, n. 4, p. 387-394, Oct. 1997.

BELKNAP, E. B. et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, Middleton, v. 31, n. 3, p. 358-365, May. 1994.

BELKNAP, E. B. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine. **Vaccine**, United Kingdom, v. 17, n. 18, p. 2297-2305, Sep. 1999.

BELTRÃO, N. et al. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 144-150, out-dez. 2000.

CARRILLO, B. J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 327-332, Jun. 1983.

CHEN, S. H. et al. Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 1, p. 520-523, Jan. 2004.

CHOWDHURY, S. I. Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 1-2, p. 13-23, Sep. 1996.

CHOWDHURY, S. I. et al. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 2094-2106, Mar. 2000.

COLODEL, E. M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 293-298, abr. 2002.

DIEL, D.G. et al. Acute e latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 3-4, p. 257-267, Apr. 2007.

DINGWELL, K. S. et al. Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 7087-7098, Nov. 1995.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, Oct. 2003.

ENQUIST, L. W. et al. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. **Advances in Virus Research**, New York, v. 51, p. 237-347, Apr. 1998.

FERRARI, M. et al. A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 123, p. 152-163, Aug-Oct. 2000.

FLORES, E. F. et al. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 5, n. 4, p. 534-540, Oct. 1993.

FRIEDLI, K.; METZLER A. E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. **Archives of Virology**, Wien, v. 94, n. 1-2, p. 109-122, May. 1987.

GOMES, L. I. et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, p. 217-220, 2002.

KAASHOEK, M. J. et al. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v.12, n.5, p. 439-444, Jun. 1994.

KAASHOEK, M. J. et al. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 342-346, Jan. 1995.

KAASHOEK, M. J. et al. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-2, p. 143-153, Jan. 1996.

KAASHOEK, M. J. et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, Amsterdam, v. 16, n. 8, p. 802-809, May. 1998.

LEE, B. J. et al. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal of Virology**, Washington, v.5, n.5, p. 474-484, Oct. 1999.

LIU, Z.F. et al. A bovine herpesvirus type 1 mutant virus specifying a carboxyl-terminal truncation of glycoprotein E is defective in anterograde neuronal transport in rabbits and calves. **The Journal of Virology**, Washington, v. 82, p. 7432-7442, Aug. 2008.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 197-206, Apr. 2003.

METZLER, A. E. et al. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, Wien, v. 87, n. 3-4, p. 205-217, May. 1986.

MULDER, W. A. et al. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. **Journal of General Virology**, London, v. 75, p. 3095-3106, Nov. 1994.

PEREZ, S. E. et al. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, Middleton, v. 39, n. 4, p. 437-444, Jul. 2002.

RISSI, D. R. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 251-260, jul. 2007.

ROIZMAN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, Wien, v. 123, n. 3-4, p. 25, Sep. 1992.

SALVADOR, S. C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 76-83, abr./jun. 1998.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, Nov. 1996.

SILVA, A. M. et al. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 89-99, Apr. 1999.

SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 403-408, out. 2007a.

SILVA, M. S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 191-199, Sep. 2007b.

SILVA, S. C. et al. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 150-159, Feb. 2010.

SNYDER, A. et al. Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 21, p. 10613-10624, Nov. 2008.

SOUZA, V. F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 13-18, Jan. 2002.

STUDDERT, M. J. A brief review of studies of bovine and equine herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 66, n. 12, p. 401-402, Nov. 1989.

TOMISHIMA, M. S.; ENQUIST, L. W. A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 154, n. 4, p. 741-752, Aug. 2001.

TIKOO S. K. et al. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

VAN OIRSCHOT, J. T. et al. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, Jan. 1996.

VOGEL, F. S. F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, Oct. 2003.

WEIBLEN, R. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, London, v. 124, n. 25, p. 666-667, Oct. 1989.

WHETSTONE, C. A. et al. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. **Archives of Virology**, Wien, v. 122, n. 1-2, p. 207-214, 1992.