

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

**PATOGENIA DA INFECÇÃO AGUDA E LATENTE PELO
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 E POR
RECOMBINANTE COM DELEÇÃO NO GENE DA
TIMIDINA QUINASE EM OVINOS**

TESE DE DOUTORADO

Gustavo Cauduro Cadore

Santa Maria, RS, Brasil
2013

**PATOGENIA DA INFECÇÃO AGUDA E LATENTE PELO HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 5 E POR RECOMBINANTE COM DELEÇÃO NO GENE DA
TIMIDINA QUINASE EM OVINOS**

por

Gustavo Cauduro Cadore

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS, Brasil.
2013

**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 Tese de Doutorado

**PATOGENIA DA INFECÇÃO AGUDA E LATENTE PELO HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 5 E POR RECOMBINANTE COM DELEÇÃO NO GENE DA
TIMIDINA QUINASE EM OVINOS**

Elaborada por
Gustavo Cauduro Cadore

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Rudi Weiblen, PhD
(Presidente/Orientador)

Eduardo Furtado Flores, PhD (UFSM)

Luizinho Caron, Dr (EMBRAPA, CNPSA)

Mário Celso Sperotto Brum, Dr (UNIPAMPA)

Renata Dezengrini Shhessarenko, Dr (UFMT)

Santa Maria, 05 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela chance de continuar vivendo, pela oportunidade de poder dizer “eu nasci de novo”, pela saúde, pela força, por me dar animo para encarar as dificuldades sem nunca pensar em desistir, por me mostrar que a felicidade está nas coisas simples, mas principalmente por colocar no meu caminho pessoas tão especiais que me acompanham todos os dias.

Gostaria de agradecer minha mãe Lizete e ao meu pai Olavo, pela educação, confiança, total apoio em todas as decisões e por sempre permanecerem ao meu lado em momentos alegres ou difíceis. Obrigado por estarem em meus pensamentos e por me passarem toda força necessária quando acreditei que tudo estava perdido.

Aos professores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores, pela oportunidade, ensinamento, disponibilidade, sábias sugestões e apoio. Obrigado por serem exemplos de dedicação ao trabalho.

Aos colegas e amigos do Setor de Virologia, não apenas pela ajuda nas horas de sufoco, mas também pelos momentos de descontração em que tive a oportunidade em conviver por este período de minha vida.

Aos profissionais da saúde que estiveram e aos que ainda estão ao meu lado nos momentos difíceis de minha vida. Obrigado pela dedicação de vocês.

Aos professores, tanto da graduação quanto da pós-graduação, que repassaram seus conhecimentos com muita dedicação e competência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, por proporcionar minha formação acadêmica e científica.

Enfim gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que torceram e que de alguma forma ainda torcem por mim.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PATOGENIA DA INFECÇÃO AGUDA E LATENTE PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 E POR RECOMBINANTE COM DELEÇÃO NO GENE DA TIMIDINA QUINASE EM OVINOS

AUTOR: GUSTAVO CAUDURO CADORE

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 05 de julho de 2013.

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus associado com meningoencefalite, uma doença de grande importância em bovinos na América do Sul. Recombinantes de alfa herpesvírus defectivos em genes não essenciais vem sendo utilizados para o estudo da função de produtos gênicos e também para a produção de vacinas. O gene da enzima timidina quinase (*tk*) tem sido deletado para produzir cepas atenuadas com fins vacinais. A enzima timidina quinase (TK) é necessária para a replicação eficiente desses vírus no sistema nervoso central (SNC), e a sua deleção ou inativação está associada com a redução da virulência. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a patogenia e caracterizar aspectos clínicos e virológicos da infecção aguda e latente pelo BoHV-5 (cepa SV-507/99) e por um recombinante com deleção no gene da *tk* (BoHV-5 $tk\Delta$) em ovinos. O *capítulo 1* relata a caracterização da infecção pelo BoHV-5 em ovinos. Durante a infecção aguda, cordeiros inoculados com o BoHV-5 (SV-507/99), excretaram vírus em secreções nasais por até 11 dias pós inoculação (pi) e desenvolveram anticorpos neutralizantes em títulos de 16 até 128. A administração de corticoides durante a latência (dia 65 pi) resultou em reativação e excreção viral durante 3 a 8 dias. Sugere-se, assim, que ovinos podem ser utilizados como modelos animais para o estudo da biologia da infecção latente pelo BoHV-5. No *capítulo 2*, investigou-se a capacidade do BoHV-5 $tk\Delta$ em estabelecer e reativar a infecção latente em ovinos. Após inoculação viral, o vírus recombinante manteve a capacidade de replicar na cavidade nasal. No dia 40 pi, DNA viral latente foi detectado nos gânglios trigêmeos (TG) de todos os animais, porém demonstrou-se, uma significativa redução (9,7 vezes; $p < 0,001$) na quantidade de DNA do vírus recombinante em relação ao vírus parental, determinado por PCR em tempo real. Após tratamento com dexametasona (Dx), não foi detectado vírus nas secreções nasais dos animais inoculados com o vírus recombinante, contrastando com a excreção viral nos

ovinos inoculados com o vírus parental. Porém, alguns suabes nasais dos animais inoculados com o BoHV-5 Δtk foram positivos para o DNA viral, indicando assim, baixos níveis de reativação. Logo, a atividade da TK no BoHV-5 não é necessária para o estabelecimento de latência, mas é crucial para uma reativação eficiente. O *capítulo 3*, relata uma investigação da capacidade do BoHV-5 e BoHV-5 Δtk em estabelecer e reativar a infecção latente em tecidos linfoides. Durante infecção latente, DNA viral foi detectado nos TGs, tonsilas faríngea e palatina e no linfonodo retrofaríngeo de todos os ovinos inoculados com ambos os vírus (parental e recombinante). No dia 40 pi, foi administrada Dx nos animais para induzir reativação viral. Foi detectado RNA mensageiro (mRNA) da glicoproteína B (gB) do BoHV-5, no TG, linfonodos retrofaríngeos e tonsilas dos cordeiros inoculados com o vírus parental. Nos animais inoculados com o BoHV-5 Δtk , mRNA foi detectado apenas nas tonsilas. Logo, sugere-se que tecidos linfoides também são sítios de latência para o BoHV-5 e do recombinante BoHV-5 Δtk , podendo estes vírus serem reativados à partir destes locais. A reativação do recombinante, no entanto parece ocorrer apenas em tecidos linfoides e não em tecidos neurais. Em resumo, os resultados deste estudo contribuem para o conhecimento da patogenia e caracterização da infecção pelo BoHV-5 e pelo recombinante.

Palavras-chave: herpesvírus recombinantes; sítios de latência; TK; modelo animal.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

PATHOGENESIS OF ACUTE AND LATENT INFECTION BY BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 AND WITH A THYMIDINE KINASE DELETION MUTANT IN SHEEP

AUTHOR: GUSTAVO CAUDURO CADORE

ADVISER: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, July 05nd 2013.

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is an alphaherpesvirus associated with meningoencephalitis, an important disease of cattle in South America. Alphaherpesvirus recombinants have been used to study the function of gene products and also for vaccine production. In particular, the gene encoding the enzyme thymidine kinase (*tk*) has been deleted to produce attenuated strains. Thymidine kinase is required for efficient replication of these viruses in the central nervous system (CNS), and its deletion or inactivation is associated with reduction of virulence. Thus, the present study aimed to investigate the pathogenesis and to characterize clinically and virologically the acute and latent infection by BoHV-5 (strain SV-507/99) and by *tk*-deleted recombinant (BoHV-5*tk*Δ) in lambs. *Chapter 1* reports the characterization of latent by BoHV-5 infection in lambs. During acute infection, lambs inoculated with BoHV-5 (SV-507/99) shed virus in nasal secretions during up to 11 days and developed viral neutralizing antibodies in titers ranging from 16 to 128. Administration of corticosteroids during latency (day 65 pi) resulted in virus reactivation and shedding for 3 to 8 days in titers up to 64. Thus, it is proposed that sheep can be used as animal models for studying the biology of latent infection by BoHV-5. In *Chapter 2*, was investigated the ability of BoHV-5*tk*Δ to establish and reactivate latent infection in lambs. After viral inoculation, the recombinant virus retained the ability to replicate in the nose of the lambs. At day 40 pi, latent viral DNA was detected in the trigeminal ganglia (TG) in all inoculated animals. However real time PCR demonstrated a significantly reduced amount of recombinant DNA (9.7-fold less, $p < 0.001$) compared to the parental virus. Following dexamethasone (Dx) treatment, infectious virus was not detected in nasal secretions of the animals inoculated with the recombinant virus, contrasting with virus shedding by lambs inoculated with the parental virus. Nevertheless, some nasal swabs from animals inoculated with BoHV-5*tk*Δ were positive for viral DNA, indicating low levels of

reactivation. Thus, BoHV-5 TK activity is not required for the establishment of latency, but seems critical for efficient virus reactivation. *Chapter 3*, reports the ability of BoHV-5 and BoHV-5tk Δ to establish and reactivate latent infection in lymphoid tissues. During latent infection, viral DNA was detected in TGs, pharyngeal and palatine tonsils and in retropharyngeal lymph node of all sheep inoculated with both viruses (parental and recombinant). At day 40 pi, Dx was administered to the animals to induce viral reactivation. Viral mRNA of BoHV-5 glycoprotein B was detected in TGs, retropharyngeal lymph node and tonsils of lambs inoculated with the parental virus. In animals inoculated with BoHV-5tk Δ , gB mRNA was detected only in tonsils. Therefore, it is suggested that lymphoid tissues are also sites of latency by BoHV-5 and the recombinant BoHV-5tk Δ , and that viruses can be reactivated from these sites. However, reactivation of recombinant virus appears to occur only in lymphoid tissues and not in neural tissues. In summary, the presented results contribute for the understanding of the pathogenesis and characterization of infection by BoHV-5 and BoHV-5tk Δ .

Keywords: recombinant herpesvirus; sites of latency; TK; animal model.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 - Excreção viral em secreções nasais durante infecção aguda em cordeiros inoculados com herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e título de anticorpos neutralizantes aos 30 dias pós-inoculação viral (dpi)..... 38

QUADRO 2 - Detecção de DNA viral por PCR durante infecção latente (30 dias após a inoculação) em secções do encéfalo de ovinos infectados experimentalmente com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)..... 39

QUADRO 3 - Excreção viral em secreções nasais após administração de corticoides e título de anticorpos neutralizantes após tratamento com dexametasona ou flumetasona em ovinos inoculados com herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)..... 40

QUADRO 4 - Detecção de DNA viral por PCR durante infecção latente (30 dias após a reativação) em diferentes secções do encéfalo de ovinos infectados experimentalmente com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)..... 41

CAPÍTULO 2

TABELA 1 (Table 1) - Virus shedding in nasal secretions during acute infection and virus neutralizing titers at day 40 post inoculation (pi) in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5*tkΔ*..... 63

TABELA 2 (Table 2) - Virus shedding in nasal secretions after dexamethasone (Dx) treatment and virus neutralizing titers at day 15 post Dx administration

(pDx) in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5 <i>tkΔ</i>	64
--	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1 (Table 1) - Virus shedding in nasal secretions during acute infection and virus neutralizing titers at day 40 post inoculation (pi) in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5 <i>tkΔ</i>	87
---	----

TABELA 2 (Table 2) - Detection of viral DNA by PCR in neural and non-neural tissues of the lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5 <i>tkΔ</i>	88
--	----

TABELA 3 (Table 3) - Virus shedding in nasal secretions and virus neutralizing antibodies after dexamethasone (pDx) treatment in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5 <i>tkΔ</i>	89
--	----

TABELA 4 (Table 4) - Detection of glycoprotein B mRNA of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) by reverse transcriptase-PCR (rt-PCR) in neural and non-neural tissues of lambs inoculated with the parental BoHV-5 (SV-507/99) or with the recombinant BoHV-5 <i>tkΔ</i>	90
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 (Fig.1) - One step growth curve of replication of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 and recombinant (BoHV-5*tk*Δ) in CRIB cells and primary lamb testicle cells. Cells were inoculated with a m.o.i of 5 and aliquots of culture supernatants were collected at different intervals and submitted to virus quantitation by limiting dilution. The results represent the mean of two repetitions..... 65
- FIGURA 2 (Fig.2) - Virus shedding during acute infection. Mean virus titers in nasal secretions of lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant (BoHV-5*tk*Δ). Data are presented as mean ± Standard Error Minimum (SEM)..... 66
- FIGURA 3 (Fig. 3) - Relative viral DNA amount in trigeminal ganglia of lambs inoculated with bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) strain SV-507/99 and a recombinant BoHV-5*tk*Δ. The relative DNA quantification was determinate using ΔΔCt method and GAPDH as a housekeeping gene. Data are presented as mean ± Standard Error Minimum (SEM)..... 67
- FIGURA 4 (Fig. 4) - Detection of viral DNA by PCR in nasal swabs of lambs submitted to dexamethasone treatment. Top panel: nested PCR for glycoprotein B (gB) gene. Lower panel: PCR for thymidine kinase (*tk*) gene, where a positive reaction indicates the presence of entire *tk* gene. *Lane M*: Molecular weight marker; *lane 1*: CRIB mock; *lane 2*: BoHV-5 (SV-507/99); *lane 3*: BoHV-5*tk*Δ; *lanes 4, 5, 6*: swabs of animals inoculated with BoHV-5*tk*Δ; *lanes 7, 8, 9*: swabs of animals inoculated with parental virus (SV-507/99)..... 68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 CAPÍTULO 1. Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente.....	22
Abstract.....	23
Resumo.....	24
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	26
Resultados.....	28
Discussão.....	30
Referências.....	34
3 CAPÍTULO 2. A thymidine kinase-deleted bovine herpesvirus 5 establishes latent infection but reactivates poorly in a sheep model.....	42
Abstract.....	43
Resumo.....	43
Introduction.....	44
Material and Methods.....	46
Results.....	51
Discussion.....	55
References.....	59
4 CAPÍTULO 3. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) and a thymidine kinase-deleted BoHV-5 in neural and non-neural tissues of experimentally infected lambs.....	69
Abstract.....	70
Resumo.....	71

Introduction.....	72
Material and Methods.....	74
Results.....	78
Discussion.....	81
References.....	83
5 CONCLUSÕES.....	91
6 REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

A subfamília *Alphaherpesvirinae* da família *Herpesviridae* abriga vários patógenos importantes de humanos e animais, incluindo o vírus do herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), vírus da varicela zoster (VZV), herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) e vírus da pseudorraiva (PRV) de suínos. Os vírus dessa família são envelopados e possuem uma molécula de DNA de fita dupla como genoma. Uma importante propriedade biológica dos vírus dessa subfamília é a capacidade de estabelecer infecções latentes nos hospedeiros, principalmente em neurônios de gânglios sensoriais e autonômicos (ROIZMAN et al., 1992; ROIZMAN & PELLETT, 2001). Essa característica é fundamental na epidemiologia e patogênica das infecções, e contribui para a perpetuação desses agentes na natureza (ROIZMAN et al., 1992; ROCK, 1994).

Os alfa herpesvírus são reconhecidos por infectar várias espécies animais, replicar de forma rápida e lítica em células de cultivo celular, possuir neurotropismo e estabelecer infecções latentes em gânglios do sistema nervoso periférico e em outros tecidos neurais (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Mesmo sendo semelhantes genética e antigenicamente, o BoHV-1 e o BoHV-5 diferem na habilidade de invadir o sistema nervoso central (SNC) e causar doença neurológica (METZLER et al., 1986; BELKNAP et al., 1994; DELHON et al., 2003). A neuroinvasão pelo BoHV-1 geralmente não vai além do gânglio trigêmeo (TG), onde a infecção latente é estabelecida (CARRILLO et al., 1983a, b; DEL MEDICO ZAJAC et al., 2009). No entanto, alguns casos de encefalite podem estar associados ao BoHV-1 (ROELS et al., 2000; SILVA et al., 2007). Já o BoHV-5 possui a capacidade de invadir e replicar em diferentes regiões do encéfalo (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003; CADORE et al., 2011).

Com base em análise de restrição genômica, os isolados de BoHV-1 eram inicialmente classificados como BoHV-1.1 (doença respiratória), ou BoHV-1.2 (doença genital). Um terceiro grupo, composto de amostras isoladas de doença neurológica era classificado como BoHV-1.3 (METZLER et al., 1986; FRIEDLI & METZLER, 1987). Estes foram posteriormente reclassificados como BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992) e diferem dos isolados respiratórios e genitais em aspectos moleculares, mas principalmente nas propriedades biológicas: o BoHV-5 é capaz de invadir e produzir

infecção no SNC causando meningoencefalite e doença neurológica (BAGUST & CLARK, 1972; NARITA et al., 1976).

O genoma completo do BoHV-5, cepa SV-507/99, foi sequenciado (DELHON et al., 2003), sendo o primeiro herpesvírus bovino a ter sua sequência genômica inteiramente conhecida. O genoma do BoHV-5 é composto por uma fita dupla de DNA linear, com 138 kb, que possui uma sequência única longa (UL) de 104 kb, flanqueada por duas regiões repetidas invertidas (IR) (DELHON et al., 2003). A região única curta (US) possui 9.5 kb e uma identidade de nucleotídeos de 80 a 90% com a sequência equivalente do BoHV-1. Diferenças genômicas importantes em relação ao BoHV-1 foram observadas em algumas regiões específicas, sobretudo na região do gene que codifica o transcrito associado a latência (LAT), na região do gene ICP0 e US (DELHON et al., 2003). Essas diferenças podem ser parcialmente responsáveis pelo distinto potencial neuropatogênico desses dois vírus.

O BoHV-1 tem sido associado com diversas manifestações clínicas, incluindo enfermidade respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR), genital (vulvovaginite infecciosa bovina, IPV; balanopostite infecciosa bovina, IPB), abortos e infecções generalizadas em neonatos (SCHUDEL et al., 1986). Já o BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite viral bovina (ROIZMAN et al., 1992). A infecção pelo BoHV-1 apresenta distribuição mundial e tem sido relatada no Brasil desde a década de 70 (RIET-CORREA et al., 1989; ROCHA et al., 1994; WEIBLEN et al., 1996). A infecção e enfermidade associadas ao BoHV-5 possuem maior importância na América do Sul, onde tem sido descritas com frequência no Brasil, Argentina e Uruguai (CARRILLO et al., 1983a, b; SALVADOR et al., 1998; RISSI et al., 2007). Também já foram relatadas na Austrália (FRENCH, 1962; JOHNSTON et al., 1962), EUA (D'OFFAY et al., 1993), Itália (MORETTI et al., 1964) e Hungria (BARTHA et al., 1969). Vários casos de enfermidade neurológica pelo BoHV-5 já foram descritos no Rio Grande do Sul (WEIBLEN et al., 1989; RISSI et al., 2007).

Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoHV-5, embora experimentalmente a infecção já tenha sido reproduzida em outras espécies de mamíferos, podendo inclusive estabelecer e reativar a infecção latente após administração de dexametasona (BÉLAK et al., 1999; SILVA et al., 1999a, b; BELTRÃO et al., 2000; ABRIL et al., 2004; DIEL et al., 2007). O BoHV-5 pode induzir infecção subclínica ou doença com severidade moderada em bovinos adultos (CASCIO et al., 1999; DEL MEDICO ZAJAC et al., 2006) e encefalite letal em animais

jovens (MEYER et al., 2001). Durante a infecção aguda, o BoHV-5 replica nas células da mucosa nasal, invadindo as terminações dos nervos autonômicos e sensoriais que inervam a mucosa, sobretudo as terminações do nervo olfatório e ramo maxilar do nervo trigêmeo (LEE et al., 1999). A seguir, os vírions invadem o SNC principalmente pela via olfatória, no sentido retrógrado a partir da mucosa nasal (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; DIEL et al., 2005). A disseminação viral no encéfalo pode possuir como consequência o desenvolvimento de doença neurológica ou o estabelecimento de infecção latente (LEE et al., 1999; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003).

A doença neurológica desenvolvida por animais infectados com o BoHV-5 é consequência da invasão e replicação viral no encéfalo (LEE et al., 1999). Inicialmente, observa-se apatia e secreção nasal e ocular, que progridem para perda de condição corporal, dificuldade respiratória, tremores, bruxismo, andar em círculos, incoordenação, cegueira, nistagmo e disfagia, chegando a convulsão e morte em estágios mais avançados (CHOWDHURY et al., 1997; PEREZ et al., 2002). Embora classicamente o BoHV-5 esteja associado a doença neurológica, este agente já foi isolado de amostras de sêmen, casos de doença respiratória, de fetos abortados e de infecções generalizadas em bezerros jovens (SILVA et al., 2007; KIRKLAND et al., 2009).

O BoHV-5 possui mais de dez glicoproteínas no envelope, que desempenham importantes funções no ciclo replicativo, tais como penetração e disseminação dos vírions além de serem alvos da resposta imunológica do hospedeiro (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Os vírions dos herpesvírus são formados pelo DNA genômico envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico, composto por 162 capsômeros. O capsídeo é envolto por uma camada proteica denominada tegumento e externamente por um envelope contendo fosfolipídeos, no qual glicoproteínas codificadas pelo genoma viral são inseridas em uma membrana lipídica dupla derivada de membranas celulares (ROIZMAN et al., 1992). O genoma do BoHV-5 codifica cerca de 70 polipeptídeos, incluindo glicoproteínas, enzimas, proteínas estruturais e regulatórias, cujos produtos podem ser classificados em essenciais e não essenciais, de acordo com a sua necessidade para a replicação viral em cultivo celular. Entretanto, todos os genes provavelmente possuem papel importante na infecção viral *in vivo* (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; DELHON et al., 2003; METTENLEITER, 2003). A deleção de alguns genes não essenciais dos herpesvírus pode resultar em redução ou incapacidade

do vírus causar doença, sem afetar a capacidade de replicação *in vitro* (ENQUIST et al., 1998).

A vacinação é uma das formas de minimizar os prejuízos causados pela infecção por herpesvírus (KAASHOEK et al., 1995). Vírus recombinantes tem sido desenvolvidos pela deleção de genes não essenciais, com a perspectiva de serem utilizados em vacinas para uso comercial, em que as deleções visam tornar a amostra vacinal não patogênica, porém retendo sua capacidade imunogênica (MOORMANN et al., 1990; CHOWDHURY, 1996; KAASHOEK et al., 1996; BELKNAP et al., 1999; FRANCO et al., 2007; BRUM et al., 2010). Além disso, a remoção de genes não essenciais pode permitir, juntamente de testes sorológicos específicos, a diferenciação entre animais vacinados de naturalmente infectados, auxiliando assim na erradicação destas infecções baseadas no uso de vacinas diferenciais (VAN OIRSCHOT et al., 1996).

A timidina quinase (TK) é uma enzima citosólica conhecida por estar envolvida na síntese de DNA, sendo responsável por introduzir desoxitimidina nas cadeias de DNA formadas (KIT, 1985). A desoxitimidina monofosfato, que é produto da reação catalisada pela TK, é fosforilada em desoxitimidina difosfato pela enzima timidilato quinase e, após, em desoxitimidina trifosfato pela enzima nucleosídeo difosfato quinase. O trifosfato é incluído em uma molécula de DNA, reação esta que é catalisada por uma DNA polimerase e uma molécula de DNA complementar (STEWART et al., 1987; SHERLEY & KELLY, 1988).

Nos vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*, a TK é codificada por um gene não essencial (*tk*). A função da enzima é fornecer deoxiribonucleotídeos para a síntese de DNA viral em células pós-mitóticas, como os neurônios (ENQUIST et al., 1998; ROIZMAN & KNIPE, 2001). Nestes vírus, a TK é absolutamente necessária para a expressão completa da virulência *in vivo* (ENQUIST et al., 1998). Assim, a ausência desta enzima no BoHV-1, PRV e HSV-1 está associada a uma significativa redução da virulência (CHOWDHURY, 1996; FERRARI et al., 2000; CHEN et al., 2006). Em camundongos inoculados na córnea com PRV defectivo na TK e PRV parental, os títulos virais nos TGs foram superiores nos animais infectados com os vírus com o gene da *tk* íntegro em relação aos seus defectivos. Já os suabes oculares apresentaram títulos semelhantes entre os dois tipos de PRV testados, ressaltando a importância da TK para replicação em tecidos nervosos (TENSER et al., 1983).

Outros estudos sugerem que gânglios contêm o genoma viral ativo e que expressam transcritos associados à latência (LAT), demonstrando que os vírus deletados na *tk* conseguem estabelecer latência (COEN et al., 1989; EFSTATHIOU et al., 1989; KRAMER et al., 1998). Após inoculação corneal do HSV em camundongos, o vírus defeutivo na TK foi comparado com o parental pela replicação aguda no local de inoculação, sendo restrito para expressão dos genes líticos nos gânglios nos primeiros dias após a inoculação. A expressão de LAT também foi comparada, mostrando que as células infectadas pelos mutantes *tk-* tiveram uma expressão aproximadamente cinco vezes menor (JACOBSON et al., 1993). Partículas virais do HSV com genoma com deleção na *tk* tiveram uma reativação inconsistente e vírus com expressão de TK tiveram replicação viral em células que não se dividem (JAMIESON et al., 1974), como os neurônios dos gânglios sensoriais. Porém, o HSV *tk-* geralmente replica bem *in vivo* em células epiteliais (JACOBSON et al., 1995). Assim, pode-se concluir que a expressão da TK, pelo menos para o HSV, é importante para a replicação viral em neurônios (TENSER et al., 1996).

Em estudo realizado com suínos inoculados com cepas diferentes de PRV defeitivos na TK, Mengeling (1991) observou que dois de quatro animais apresentaram reativação viral após administração de corticoides, excretando vírus em secreções nasais por até 7 dias, sugerindo que a atividade da TK pode não desempenhar um papel fundamental na reativação dos *Alphaherpesvirus* em seus hospedeiros naturais. Entretanto, a situação pode diferir em modelos animais, embora as infecções latentes com *tk-* do HSV-1 tenha estabelecido latência em camundongos (SEARS et al., 1985; COEN et al., 1989; TENSER et al., 1989) e coelhos, uma subsequente reativação foi observada apenas em coelhos (CAUDALL et al., 1986).

Entre os *Alphaherpesvirus*, a TK é absolutamente necessária para a expressão completa da virulência *in vivo* (ENQUIST et al., 1998). Porém, o envolvimento da TK na neuropatogênese do BoHV-5 ainda não foi totalmente elucidado, pois cepas do BoHV-5 defeitivas para esta enzima ainda não foram completamente avaliadas *in vivo*. Estudos demonstram que variantes do BoHV-5 com o gene da *tk* deletado e também variantes resistentes a brivudina, provavelmente, deficientes na atividade da enzima TK, foram atenuados e imunogênicos quando inoculados em coelhos e bovinos (ANZILIERO et al., 2011; BRUM et al., 2010; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2010). A redução da virulência *in vivo*, faz com que a TK seja um alvo atrativo para a produção de vacinas atenuadas (CHOWDHURY et al., 1997; VAN OIRSCHOT, 1999).

Os herpesvírus podem perpetuar-se no animal infectado e na população pelo estabelecimento de infecções latentes (ROIZMAN et al., 1992). Durante a infecção primária, o vírus replica nas células epiteliais das mucosas oronasal ou genital, penetrando nas terminações dos neurônios que inervam essas regiões. Após, o vírus é transportado ao longo dos axônios para os corpos neuronais que se localizam nos gânglios sensoriais e autonômicos regionais. Nos corpos neuronais, o vírus pode replicar de forma aguda ou estabelecer infecção latente (ROCK, 1993; 1994).

A rota mais consistente de invasão do sistema nervoso periférico pelo BoHV-1 parece ser os nervos sensoriais e a replicação aguda pode ser detectada no TG poucas horas após a inoculação (BAGUST & CLARK, 1972; NARITA et al., 1976). Já o BoHV-5 é facilmente isolado do bulbo olfatório de coelhos e antígenos virais podem ser detectados no TG destes animais após dois ou quatro dias da inoculação (LEE et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000). Isso sugere que o transporte pela via olfatória e passagem pelo bulbo olfatório seja uma rota importante de acesso do BoHV-5 ao SNC durante a infecção aguda (LEE et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000).

A infecção latente pode ser reativada naturalmente, durante episódios de estresse, ou artificialmente, pela administração de corticoides, sendo geralmente acompanhada de excreção viral e, ocasionalmente, de recrudescência clínica (CARON et al., 2002; VOGEL et al., 2003). O exato mecanismo pelo qual a dexametasona (Dx) induz a reativação da infecção não é conhecido, mas sabe-se que esse composto é um transativador de genes virais e celulares (ROCK et al., 1992). Durante a infecção latente, a transcrição do genoma viral restringe-se ao LAT, que apresenta localização nuclear (ROCK, 1993). A exata função dos LAT para o estabelecimento e manutenção da latência ainda não está bem definida, no entanto, sabe-se que o LAT não é um requerimento absoluto para o estabelecimento e/ou reativação (ROCK et al., 1992; ROCK, 1993; RANDALL & ROIZMAN, 1994).

A incapacidade de alguns vírus com certas deleções de genes em reativar o estado de latência em seus hospedeiros pode ser resultado de uma replicação deficiente nos tecidos alvos primários (JACOBS, 1994). Como consequência, a reativação destes vírus, se ocorrer, pode ser um evento infrequente (MENGELING et al. 1992; WATKINS et al. 1998). Pesquisas com mutantes na TK mostram que esta enzima viral é importante no estabelecimento de infecção aguda e latente no TG (FIELD & WILDY, 1978; TENSER & DUNSTAN, 1979; KLEIN et al., 1980). A capacidade dos vírus TK

deletados em estabelecer latência não é afetada, mas sua reativação e consequente replicação são seriamente comprometidas (TIKOO et al., 1995).

Os principais sítios de latência dos alfa herpesvírus são os neurônios de gânglios sensoriais e autonômicos (ROCK, 1994). É consenso de que a infecção latente nesses locais apresenta grande significado na recorrência da infecção e subsequente transmissão viral (STEINER & KENNEDY, 1995). No entanto, em alguns alfa herpesvírus tem sido observada infecção latente em outros sítios neurais e também em sítios não neurais, embora com menor frequência que no TG (WAGNER & BLOOM, 1997).

O DNA do BoHV-1 já foi encontrado na tonsila faríngea (WINKLER et al., 2000), sangue periférico (FUCHS et al., 1999), linfonodos e baço (MWEENE et al., 1996). Já o DNA do BoHV-5 foi detectado em vários locais do SNC de bovinos, coelhos e ovinos infectados experimentalmente, durante a infecção latente, incluindo o bulbo olfatório, cerebelo, ponte, tálamo, medula e diferentes áreas do córtex (VOGEL et al., 2004; SILVA et al., 2010; CADORE et al., 2011). Em animais submetidos a reativação com Dx e posteriormente examinados, a distribuição do DNA viral no SNC foi mais ampla. Nesses animais, o DNA do BoHV-5 foi detectado em sítios adicionais. Esses resultados sugerem que, além de estabelecer latência em vários locais do SNC, a reativação em áreas profundas do encéfalo resulta em produção de vírions infecciosos e na colonização e estabelecimento de latência em sítios adicionais (VOGEL et al., 2003).

Na mucosa epitelial, a intensidade da multiplicação viral irá depender basicamente da resposta imune adquirida pela exposição natural ou pela vacinação (PASTORET et al., 1979). A replicação viral devido a reativação pode resultar na disseminação viral para outros hospedeiros susceptíveis (ACKERMANN et al., 1982; THIRY et al., 1987) sendo que a capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes constitui-se em importante propriedade destes agentes, permitindo assim a sua manutenção na natureza (ROCK, 1994).

No presente trabalho são descritos experimentos realizados para estudar a patogenia e caracterização dos aspectos clínicos e virológicos da infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o BoHV-5 e por um recombinante com deleção no gene da TK (BoHV-5 $tk\Delta$). No Capítulo 1 é descrita a caracterização da infecção latente do BoHV-5 parental em cordeiros, objetivando validar o uso destes animais como modelo experimental. O Capítulo 2 relata a investigação da latência e reativação em ovinos inoculados com BoHV-5 parental (SV-507/99) e com o recombinante BoHV-

5tkΔ. No Capítulo 3 foi investigado o ciclo latência-reativação em sítios neurais e não neurais em ovinos infectados experimentalmente.

2. CAPÍTULO 1

Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente

Gustavo Cauduro Cadore¹, Deniz Anziliero¹, Rudi Weiblen² e Eduardo F. Flores^{2*}

Artigo publicado na Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(12):1090-1096, 2011.

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900.

² Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: eduardofurtadoflores@gmail.com

ABSTRACT.- Cadore G.C., Anziliero D., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. **[Reactivation and distribution of bovine herpesvirus 5 DNA in the brain of latently infected sheep.]** Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(12):1090-1096. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

The biology of latent infection by bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) has been studied in cattle and rabbits, yet many aspects remain poorly understood. We herein to investigate the suitability of lambs to understand aspects of BoHV-5 latency. Thirteen six-month-old lambs inoculated intranasally (IN) with BoHV-5 strain SV-507/99 (titer of $10^{6.8}$ TCID₅₀/mL) shed the virus in nasal secretions in titers up to $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL, during up to 11 days, developing virus neutralizing (VN) titers of 16 to 128 at day 30 post-inoculation (pi). The inoculated animals developed only a mild serous nasal secretion and transient hyperthermia. Examination of brain sections of five lambs euthanized at day 30 pi by PCR revealed the presence of latent DNA in the trigeminal ganglia (TG, 5 out of five), olfactory bulbs (OB, 5/5), pons (2/5), cerebellum (2/5) and cerebral cortex (1/5). Administration of dexamethasone (Dx, n=4) or flumethasone (FluM, n=4) to eight latently infected lambs at day 65 pi resulted in virus reactivation and shedding by 3 out of 4 individuals in each group. Virus shedding in nasal secretions started at day 3 post-treatment and lasted up to five days (1-5) in Dx treated lambs (titers up to $10^{2.8}$ TCID₅₀/mL), was delayed and lasted up to three days (1-3) in FluM-treated lambs (titers up to $10^{2.1}$ TCID₅₀/mL). PCR examination of the brains of animals submitted to reactivation, at day 30 post-treatment, showed a pattern of distribution of latent viral DNA fairly similar to that found in those not submitted to reactivation. In summary, the ability of BoHV-5 to establish latent infection, the consistent colonization of TGs and OBs by latent viral DNA and virus reactivation induced by corticosteroid treatment are promising findings towards the use of lambs to study selected aspects of BoHV-5 latency.

INDEX TERMS: BoHV-5, latency, lambs, animal model, corticoids.

RESUMO.- [Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente.]

A biologia da infecção latente pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) tem sido estudada em bovinos e coelhos, mas vários aspectos permanecem desconhecidos. Este artigo relata uma avaliação de ovinos jovens como modelo para o estudo da infecção latente pelo BoHV-5. Treze cordeiros com idade entre seis e sete meses, inoculados pela via intranasal (IN) com a cepa SV-507/99 do BoHV- 5 (título de $10^{6,8}$ DICC₅₀/mL) excretaram o vírus em secreções nasais em títulos de até $10^{5,5}$ DICC₅₀/mL, com duração de até 11 dias, desenvolvendo anticorpos neutralizantes em títulos de 16 a 128 no dia 30 pós-inoculação (pi). Os ovinos inoculados apresentaram apenas secreção nasal serosa leve e hipertermia transitória. O PCR de secções do encéfalo de cinco animais inoculados no dia 30 pi revelou a presença de DNA viral latente nos gânglios trigêmeos (TG, 5 de 5 animais), bulbo olfatório (BO, 5/5), ponte (2/5), cerebelo (2/5), córtex cerebral (1/5). Administração de dexametasona (Dx, n=4) ou Flumetasona (FluM, n=4) a oito ovinos no dia 65 pi resultou em reativação e excreção viral por 3 de 4 animais de cada grupo. A excreção viral nas secreções nasais iniciou no dia 3 pós-tratamento e durou entre 1 e 5 dias nos ovinos tratados com Dx (títulos até $10^{2,8}$ DICC₅₀/mL) e foi mais tardia, durando entre 1 e 3 dias nos animais tratados com FluM (títulos de $10^{2,1}$ DICC₅₀/mL). Uma análise por PCR do encéfalo dos animais submetidos à reativação, no dia 65 pós-infecção, revelou uma distribuição do DNA latente semelhante àquela observada nos animais não submetidos à reativação. Em resumo, a capacidade do BoHV-5 estabelecer infecção latente, a colonização dos TGs e BOs com DNA viral latente e a reativação induzida por corticoides são achados promissores para o uso de ovinos como modelo para a infecção latente pelo BoHV-5.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BoHV-5, latência, cordeiros, modelo animal, corticoides.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus neurovirulento, frequentemente associado com doença neurológica em bovinos jovens (Studdert 1990, Rissi et al. 2007). Casos esporádicos ou pequenos surtos da infecção pelo BoHV- 5 já foram relatados em vários países, mas a doença é particularmente frequente na

Argentina e no Brasil, onde vários surtos tem sido relatados a cada ano (Carrillo et al. 1983, Riet-Correa et al. 1989, Weiblen et al. 1989, Salvador et al. 1998, Rissi et al. 2007). Nestes países, a doença neurológica pelo BoHV-5 possui grande repercussão sanitária e econômica, muitas vezes confundindo-se com a raiva, a causa mais comum de encefalite em bovinos nas Américas (Barros et al. 2006). O BoHV-5 é genética e antigenicamente relacionado ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), agente da rinotraqueíte infecciosa (IBR), balanopostite e vulvovaginite pustular bovina (IPB/IPV) (Kahrs 2001). Assim como outros alfa herpesvírus, o BoHV-5 é capaz de estabelecer e reativar infecção latente em seus hospedeiros (Vogel et al. 2003).

Após replicação na mucosa nasal, o BoHV-5 invade as terminações nervosas locais e é transportado por fibras nervosas até o sistema nervoso central (SNC), onde replica ativamente e dissemina-se produzindo meningo-encefalite aguda de curso geralmente fatal (Bagust & Clark 1972, Belknap et al. 1994). Em alguns animais, a invasão do encéfalo é restrita e o vírus estabelece infecção latente nos gânglios trigêmeos (TG) e em outros sítios do SNC (Perez et al. 2002, Vogel et al. 2003). A infecção latente pode ser reativada naturalmente ou pode ser induzida pela administração de corticoides (Perez et al. 2002, Vogel et al. 2003). A patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5 tem sido estudada nos hospedeiros naturais (Belknap et al. 1994, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002, Vogel et al. 2003) e em modelos animais (Silva et al. 1999b, Caron et al. 2002). Em particular, coelhos tem sido muito utilizados para estudar vários aspectos da neuropatogenia do BoHV-5, pois desenvolvem a infecção e doença neurológica similar àquela em bovinos (Meyer et al. 1996, Chowdhury et al. 1997, Silva et al. 1999a, Caron et al. 2002). Infecções experimentais com o BoHV-5 também foram realizadas com sucesso em caprinos (Diel et al. 2007) e em ovinos (Belák et al. 1999, Silva et al. 1999b).

Ovinos inoculados pela via intranasal excretam o vírus em títulos variáveis e podem, eventualmente, desenvolver doença neurológica (Belák et al. 1999, Silva et al. 1999b). Após a infecção aguda, o vírus estabelece infecção latente, podendo ser reativado e transmitido a sentinelas após a administração de corticoides (Silva et al. 1999b). Essas inoculações experimentais foram motivadas por uma possível participação de ovinos na epidemiologia do BoHV-5, devido a relatos de sorologia positiva ao vírus em rebanhos ovinos (Lindner et al. 1993). Essa hipótese, no entanto, mostrou-se improvável e, por isso, tem sido pouco considerada ao longo dos anos (Ackermann & Engels 2006). Não obstante a improvável importância epidemiológica, a

susceptibilidade de ovinos ao BoHV-5 pode ser explorada para estudar aspectos pouco conhecidos da infecção, sobretudo da infecção latente. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a infecção latente pela cepa SV-507/99 do BoHV-5 em ovinos jovens, com vistas à utilização desses animais como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Treze cordeiros foram inoculados pela via intranasal (IN) com o BoHV-5 (cepa SV-507/99), e dois cordeiros foram inoculados com meio essencial mínimo (MEM). Os animais foram submetidos a monitoramento clínico, virológico e sorológico nos dias seguintes à inoculação. No dia 30 pós-inoculação (pi), cinco cordeiros inoculados e um controle foram eutanasiados para a coleta do encéfalo. Várias secções do encéfalo foram coletadas individualmente e submetidas à reação da polimerase em cadeia (PCR) para a pesquisa de DNA viral latente. Os cordeiros restantes foram submetidos a tratamento com corticoides no dia 65 pi, e monitorados nos dias seguintes ao tratamento. Trinta dias após, esses animais foram eutanasiados para a coleta do encéfalo para pesquisa de DNA viral por PCR.

Células e vírus

Para a multiplicação, quantificação, isolamento viral e testes de soro-neutralização (SN) foram utilizadas células de linhagem de rim bovino CRIB (Flores & Donis 1995), cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, Brasil). O vírus utilizado para a inoculação foi a cepa SV-507/99, isolada de um surto de meningoencefalite no sul do Brasil (Delhon et al. 2003). O inóculo consistiu de 2 mL de suspensão viral contendo $10^{6,8}$ DICC₅₀/mL.

Animais, inoculação de vírus e monitoramento

Foram utilizados 15 cordeiros da raça Ideal, de ambos os sexos, com idade entre 6 e 7 meses. Treze animais foram inoculados com 2 mL da suspensão viral IN (1 mL em cada narina). Dois animais foram mantidos como controles e foram inoculados com MEM. Após inoculação, os animais foram avaliados clinicamente (coloração e secreção

na mucosa nasal, sinais respiratórios e sistêmicos). Suabes nasais foram coletados diariamente durante 15 dias e amostras de sangue para sorologia foram coletadas nos dias zero (dia da inoculação), 15, 30, 65 (dia do início da administração de corticoides) e 80 dias pi. Também foram coletados suabes nasais a intervalos semanais até o dia da administração de corticoides.

Os suabes foram submetidos à pesquisa de vírus em monocamadas de células CRIB, sendo realizadas três passagens de cinco dias cada. As amostras que foram positivas para vírus foram posteriormente quantificadas pela técnica de diluição limitante, e os títulos foram calculados de acordo com Reed & Muench (1938) e expressos como Log_{10} doses infectantes para 50% dos cultivos celulares por mL ($\text{DICC}_{50}/\text{mL}$). As amostras de soro foram submetidas à técnica de soroneutralização (SN) em microplacas para a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o vírus homólogo, conforme descrito por Vogel et al. (2003).

Trinta dias após a inoculação (pi), cinco animais inoculados e um controle foram submetidos à eutanásia para a coleta do encéfalo para pesquisa de DNA latente. Foram coletadas individualmente as seguintes secções: gânglios trigêmeos (TG), bulbo olfatório (BO), tálamo (TA), ponte (PO), cerebelo (CB) e córtex cerebral (CC), este sendo um *pool* dos córtices anterior/parietal/ocipital.

Reativação da infecção

No dia 65 pi, os animais restantes (n=8) foram alocados em dois grupos de quatro animais cada e submetidos a administração de corticoides, na tentativa de reativar a infecção latente. Ambos os grupos receberam cinco administrações, em dias consecutivos, do respectivo fármaco, pela via intramuscular. O grupo I (Cordeiros 1, 6, 8, 12) recebeu acetato de dexametasona (Decadronal®, Aché) na dose de 0,2 mg/kg/dia. O grupo II (Cordeiros 2, 4, 5 e 11) recebeu Flumetasona (Flucortan®, Fort Dodge) na dose de 0,15 mg/kg/dia. O animal controle recebeu o tratamento com Dx. Durante 15 dias consecutivos após o tratamento, suabes nasais foram coletados para a pesquisa de vírus. Sangue foi coletado para sorologia no dia 15 após a administração de corticóides.

Trinta dias após o início do tratamento com corticóides, cinco dos cordeiros inoculados que receberam o tratamento com corticoides foram submetidos à eutanásia para a coleta do encéfalo para pesquisa de DNA latente, como já descrito na infecção

aguda. Três animais inoculados morreram de causas não relacionadas e não foram incluídos na fase final do experimento.

Extração de DNA e *nested* PCR

O DNA total dos tecidos foi extraído de aproximadamente 150 mg de cada amostra tecidual. Os fragmentos de tecido foram submetidos à digestão com proteinase K (20 mg/mL) e RNase A (10 mg/mL) em tampão de digestão (0,01 M Tris; 0,001 M EDTA; 0,1 M NaCl; 1% SDS; pH 7,4) e submetidos a extração de DNA total com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) de acordo com Vogel et al. (2003). Após a extração, a concentração de DNA em cada amostra foi mensurada através de absorvância por luz ultravioleta a 260 nm.

O DNA total extraído das amostras teciduais foi submetido a uma reação de *nested* PCR conforme Diel et al. (2007), utilizando-se iniciadores para a região codificante do gene da glicoproteína B: posições 57,143 e 57,782 (iniciadores externos 1 e 2) e 57,338 e 57,416 (iniciadores internos 3 e 4). As condições utilizadas para realização do PCR foram: denaturação inicial (94°C por 10 min), seguidos por 35 ciclos de denaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (56°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos); com uma extensão final (72°C por 10 minutos). Como controles positivos e negativos foram utilizadas secções do encéfalo de bezerros inoculados com o BoHV-5 e que foram positivas para vírus no isolamento em cultivo celular, e encéfalo de um animal não inoculado, respectivamente.

As secções do encéfalo que foram positivas para DNA viral por PCR foram posteriormente submetidas a tentativas de isolamento viral. Para isso, homogenados teciduais (10% peso/volume) foram inoculados em células CRIB e submetidos a três passagens de 5 dias cada.

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (Proc.#23081-013798).

RESULTADOS

Durante a infecção aguda, todos os cordeiros inoculados com o BoHV-5 excretaram o vírus nas secreções nasais, com duração e títulos variáveis (Quadro 1). Em dois cordeiros, a excreção viral foi detectada até o dia 11 pi, porém a maioria cessou a

excreção nos dias 6 e 7 pi. Em alguns animais a excreção foi detectada de forma intermitente. O pico de excreção viral ocorreu entre os dias 2 e 3 pi, com títulos médios de $10^{4,2}$ DICC₅₀/mL e $10^{3,2}$ DICC₅₀/mL respectivamente, e título máximo $10^{5,5}$ DICC₅₀/mL no dia 2 pi. Não foi detectada infectividade nas secreções nasais coletadas após o dia 12 pi, caracterizando o final da infecção aguda. Alguns animais inoculados apresentaram um discreto corrimento nasal seroso, leve hiperemia da mucosa nasal e hipertermia transitória, com duração de 1 a 4 dias, atingindo 42°C. Todos os animais desenvolveram anticorpos contra ao BoHV-5 após a infecção aguda, apresentando títulos neutralizantes entre 16 a 128 no dia 30 pi (Quadro 1). Esses resultados demonstram que o BoHV-5 SV-507/99 replicou com eficiência na cavidade nasal dos ovinos, sendo excretado em títulos moderados por vários dias. Os títulos de anticorpos neutralizantes desenvolvidos também demonstram a replicação viral eficiente. Os animais não desenvolveram sinais clínicos importantes, contrastando com a doença neurológica frequentemente desenvolvida por bezerros e coelhos inoculados com a cepa SV-507/99 (Vogel et al. 2003, Flores et al. 2009). Os dois cordeiros mantidos como controles permaneceram saudáveis durante o monitoramento, não excretaram vírus e permaneceram soronegativos. Os suabes nasais coletados a intervalos semanais até o dia da administração de corticoides foram negativos para vírus.

A distribuição do DNA latente do BoHV-5 no encéfalo dos cordeiros submetidos à eutanásia no dia 30 pi está apresentada no Quadro 2. O DNA viral foi detectado por PCR nos gânglio trigêmeos (5/5) e nos bulbos olfatórios (5/5) de todos os animais avaliados. Também foi detectado, embora com menor frequência, na ponte (2/5), cerebelo (2/5) e córtex cerebral (1/5). Todas as secções do encéfalo do animal controle foram negativas para DNA viral por PCR. Tentativas de isolamento de vírus das secções positivas no PCR foram negativas, indicando a presença de DNA sem replicação viral, o que caracteriza a infecção latente. Esses resultados demonstram que o BoHV-5 estabelece infecção latente no TG, BO e também em outros sítios do SNC de ovinos infectados experimentalmente.

A administração de corticoides (Dx ou FluM) a partir do dia 65 pi em oito animais inoculados com o BoHV-5 resultou na reativação viral em seis animais (75%). Os dois fármacos resultaram em frequência igual de reativação (3 de 4 animais em cada grupo), porém os animais tratados com Dx apresentaram um período de excreção mais longo (Quadro 3). Em quatro animais, a excreção viral iniciou no dia 3 pós-tratamento (pt), com dois deles (grupo FluM) apresentando uma excreção mais tardia. Nos animais

tratados com Dx, a média de excreção foi de 3,7 dias (1-5), e o título máximo foi de $10^{2.8}$ DICC₅₀/mL. Nos animais tratados com FluM, a média de excreção foi de 2 dias, com título máximo de $10^{2.1}$ DICC₅₀/mL. Além da excreção viral, dois animais do grupo Dx apresentaram um aumento (4x) no título de anticorpos neutralizantes. Os animais do grupo FluM, mesmo aqueles que excretaram o vírus, não apresentaram aumento igual ou maior que 4x nos títulos. Não foram observadas alterações clínicas após a administração de corticoides. O animal controle não excretou vírus e permaneceu soronegativo após o tratamento com Dx. Esses resultados demonstram que o tratamento com corticoides foi capaz de reativar a infecção latente em 75% dos animais inoculados com o BoHV-5 SV-507/99. Embora o número pequeno de animais por grupo não permita grandes inferências, a Dx aparentemente foi mais efetiva em induzir reativação, resultando em excreção durante um período mais longo e em títulos maiores.

Cinco dos cordeiros que receberam tratamento para reativar a infecção foram posteriormente submetidos à eutanásia, no dia 30 pós-tratamento, para a pesquisa de DNA viral no encéfalo. A distribuição do DNA latente do BoHV-5 no encéfalo desses animais está apresentada no Quadro 4. O DNA viral foi detectado no bulbo olfatório e também no cerebelo em 4 de 5 cordeiros avaliados, no gânglio trigêmeo (3/5) e na ponte (2/5). No *pool* do córtex cerebral e no tálamo não foi detectado DNA viral em nenhum dos animais. Tentativas de isolamento viral das secções positivas no PCR resultaram negativas.

DISCUSSÃO

Dois estudos anteriores investigaram a susceptibilidade de ovinos à infecção pelo BoHV-5, com ênfase a uma possível participação dessa espécie na epidemiologia da infecção. Foi demonstrado que cordeiros são susceptíveis à infecção pela cepa de referência N569. Dois entre quatro cordeiros inoculados pela via nasal desenvolveram doença neurológica aguda, que foi descrita em seus aspectos clínicos e patológicos (Belák et al. 1999). Outro estudo envolveu a inoculação de dois isolados sul-americanos do BoHV-5 (EVI-88 e A663) em cordeiros, em que os animais inoculados excretaram o vírus por vários dias e um deles desenvolveu doença neurológica com características clínicas e patológicas semelhantes às aquelas desenvolvidas por bovinos. Neste mesmo estudo foi possível demonstrar a reativação experimental da infecção e a transmissão do

vírus a animais sentinela, reforçando a hipótese epidemiológica (Silva et al. 1999b). No entanto, a hipótese da participação de ovinos na transmissão do BoHV-5 na natureza não acumulou evidências e tem sido pouco considerada a partir de então. Da mesma forma, a susceptibilidade de ovinos ao BoHV-5 não foi posteriormente explorada. Assim, o presente trabalho foi realizado para estudar a susceptibilidade dessa espécie, avaliando sua adequação como modelo experimental para o BoHV-5, sobretudo para estudos da infecção latente.

Além dos ovinos possuírem algumas propriedades desejáveis em um modelo animal, a presente investigação justifica-se por vários aspectos; *(i)* a cepa SV-507/99 constitui-se na cepa mais estudada e melhor caracterizada de BoHV-5, tanto em nível molecular quanto biológico. Durante anos, esta cepa foi submetida a diversos estudos de patogenia em bovinos (Vogel et al. 2002, 2003), coelhos (Silva et al. 1999a, Beltrão et al. 2000, Caron et al. 2002, Mayer et al. 2006, Dezengrini et al. 2009) e caprinos (Diel et al. 2007). O SV-507/99 foi submetido ao sequenciamento completo do genoma, sendo a primeira cepa de herpesvírus bovino a ter a sua sequência genômica inteiramente determinada (Delhon et al. 2003). Apesar de sua extensiva caracterização, a cepa SV-507/99 ainda não havia sido inoculada em ovinos, desconhecendo-se a sua biologia e o seu potencial neurovirulento nessa espécie; *(ii)* a cepa SV-507/99 tem sido alvo de manipulação genética para a produção de mutantes defectivos em genes específicos, como a glicoproteína E (gE) e enzima timidina quinase (TK), e ambos gE/TK (Brum et al. 2010). O fenótipo desses recombinantes tem sido estudado em coelhos (Silva et al. 2010) e em bezerros (Santos et al. 2010). Os recombinantes defectivos na gE, TK e ambos gE/TK também tem sido avaliados como candidatos a cepas vacinais (Anziliero et al. 2011). Assim, um modelo animal teria uma grande utilidade para estudos de fenótipos de recombinantes do BoHV-5 defectivos em genes específicos; *(iii)* a maior proximidade filogenética entre ovinos e bovinos, hospedeiros naturais do BoHV-5. Essa proximidade certamente representa uma vantagem em relação aos coelhos - outra espécie utilizada como modelo para o BoHV-5, pois teoricamente produz achados mais similares e extrapoláveis aos observados em bovinos; *(iv)* a maior resistência dos ovinos à infecção neurológica aguda, o que resulta em taxas de sobrevivência compatíveis com estudos da infecção latente. Os coelhos são muito susceptíveis à infecção neurológica aguda pelo SV-507/99 e, mesmo quando inoculados com doses virais baixas, grande parcela dos animais sucumbe à infecção aguda (Mayer et al. 2006, Flores et al. 2009). Isso reduz muito o número de animais que

sobrevivem para estudos da infecção latente. Assim, é necessário um número grande de animais e/ou doses de vírus progressivamente mais baixas, o que pode comprometer a qualidade dos achados. Mesmo os bovinos jovens são mais susceptíveis e sucumbem à infecção aguda com maior frequência do que os ovinos (Vogel et al. 2003). Dessa forma, ovinos jovens foram inoculados com a cepa SV-507/99 e monitorou-se a infecção aguda, a capacidade de reativação da infecção latente sob diferentes tratamentos e, finalmente, a distribuição do DNA viral latente no encéfalo pré e pós-reativação.

Durante a infecção aguda, a excreção viral nas secreções nasais estendeu-se até o dia 11 pi em dois animais, cessando entre os dias 6 e 7 pi na maioria deles. Os títulos de vírus nas secreções nasais atingiram $10^{5,5}$ TCID₅₀/mL. No estudo de Belák et al. (1999), a excreção viral não foi quantificada, mas foi muito irregular e inconsistente entre os animais durando entre 3 e 10 dias. No experimento relatado por Silva et al. (1999b), os isolados sul-americanos do BoHV-5 foram excretados por até 15 dias, com títulos máximos de $10^{7,1}$ e $10^{5,9}$ TCID₅₀/mL, para a cepa EVI-88 e A663 respectivamente. Nos experimentos realizados em bezerros (Beltrão 2000, Vogel et al. 2002, 2003), tanto os títulos virais excretados (até $10^{7,1}$ TCID₅₀/mL) como a duração da excreção (até 18 dias em alguns animais) foram superiores ao observados no presente estudo. Essas diferenças não são surpreendentes e refletem a maior susceptibilidade de bovinos ao vírus. Não obstante, os níveis de replicação da cepa SV-507/99 durante a infecção aguda observada no presente estudo foram suficientes para o estabelecimento de latência nos animais inoculados. A soroconversão ao BoHV-5 observada em todos os animais inoculados, em títulos entre 16 e 128, também reflete a eficiência da replicação viral.

O estudo de Belák et al. (1999) concentrou-se na infecção aguda, não investigando a infecção latente. No estudo de Silva et al. (1999b), a frequência de reativação da infecção após administração de Dx em ovinos, foi de 2 entre 3 (isolado A663) e 8 de 10 (EVI-88), com duração média de excreção viral de 2,5 dias (A663) e 7,0 dias (EVI-88). No presente estudo, 3 de 4 ovinos de cada grupo (Dx e FluM) excretaram o vírus após o tratamento, e a duração média de excreção foi de 3,7 dias (Dx) e 2 dias (FluM). Em bovinos, a excreção do BoHV-5 após administração de Dx ocorre em títulos mais elevados (até $10^{7,1}$ TCID₅₀/mL) e com maior duração (até 12 dias) (Vogel et al. 2002, 2003). No estudo de Silva et al. (1999b), independente das variações de frequência de reativação, duração e magnitude da excreção viral, os dois

isolados foram reativados experimentalmente pela administração de Dx. A dose e o regime de administração de Dx utilizados naquele estudo foram os mesmos utilizados no presente experimento (0,2 mg/kg durante cinco dias). Essa dose é aproximadamente duas vezes a dose utilizada na reativação do BoHV-1 e BoHV-5 em bezerros (Vogel et al. 2002, 2003). A FluM também demonstrou ser capaz de reativar a infecção latente pelo BoHV-5, embora resultando em excreção viral mais tardia e menos duradoura do que a induzida pela Dx (Quadro 3). Dessa forma, a Dx parece ser mais indicada para a reativação experimental da infecção latente pelo BoHV-5 em ovinos.

Além do TG - sítio mais consistente de latência dos alfa herpesvírus - o DNA latente do BoHV-5 SV-507/99 foi detectado consistentemente no BO e, também, com menor frequência, em outras áreas do encéfalo (Quadros 2 e 4). Essa distribuição apresenta um padrão um pouco mais restrito ao observado em bezerros (Vogel et al. 2003) e coelhos (Mayer et al. 2006). Nessas espécies, vários outros sítios de latência foram detectados no SNC, além do TG. A distribuição mais ampla do DNA latente do BoHV-5, em comparação com o BoHV-1, provavelmente deve-se a sua maior neuroinvasividade, que permite que o vírus atinja e estabeleça latência em regiões mais profundas do SNC (Vogel et al. 2003, Mayer et al. 2006). O significado desses sítios adicionais de latência pelo BoHV-5, no entanto, permanece desconhecido. É possível que possuam significado biológico, mas é também possível que sejam achados meramente circunstanciais (Vogel et al. 2003, Mayer et al. 2006).

A distribuição do DNA latente no encéfalo dos animais sacrificados 30 dias após a reativação não apresentou diferenças marcantes em relação aos examinados antes da reativação, com exceção de uma frequência maior no cerebelo (Quadros 2 e 4). Em bezerros e coelhos, a reativação da infecção é seguida de uma distribuição mais ampla do DNA latente, sugerindo que sítios adicionais são colonizados a partir de progênie viral produzida durante a reativação (Vogel et al. 2003, Mayer et al. 2006). O número pequeno de ovinos utilizados no presente estudo não permitiu que se investigasse esse aspecto com mais detalhes. A falha em detectar DNA latente em alguns TGs e OBs no dia 30 após administração de corticoides, possivelmente ocorreu devido a limitações de sensibilidade do PCR utilizado, visto que essas secções são geralmente positivas para DNA latente do BoHV-5 em bovinos (Vogel et al. 2003).

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram a susceptibilidade de ovinos ao BoHV-5, cepa SV-507/99. Embora apresentem uma susceptibilidade aparentemente menor do que os bovinos - hospedeiros naturais do vírus - os ovinos

suportam níveis moderados de replicação viral durante a infecção aguda. A replicação viral durante a infecção aguda foi suficiente para o estabelecimento da infecção latente em vários sítios do SNC, e o vírus foi reativado e excretado após a administração de corticoides. Assim, resguardadas as restrições inerentes ao uso de modelos animais, os ovinos parecem ser adequados para o estudo de aspectos da biologia da infecção latente pelo BoHV-5.

REFERÊNCIAS

- Ackermann M. & Engels M. 2006. Pro and contra IBR eradication. *Vet. Microbiol.* 113:293-302.
- Anziliero D., Santos C.M.B., Bauermann F.B., Cardozo L., Bernardes L.M., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is attenuated and immunogenic for calves. *Pesq. Vet. Bras.* 31(1):23-30.
- Bagust T.L. & Clark L. 1972. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.* 82:375-383.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil. Vallée, Montes Claros, MG. 207p.
- Belák L., Kucsera C., Ros G., Kulcsár L., Makranszki T.S. & Belák S. 1999. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comp. Immunol. Microbiol.* 22:207-220.
- Beltrão N. 2000. Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5): infecção experimental de bovinos e utilização de coelhos como modelo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 88p.
- Beltrão N., Flores E.F., Weiblen R., Silva A.M., Roehe P.M. & Irigoyen L.F. 2000. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesq. Vet. Bras.* 20:144-150.
- Belknap E.B., Collins J.K., Ayers V.K. & Schultheiss P.C. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Pathol.* 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.
- Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Odeon A. & Sur J-H. 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type- 5 in experimentally

infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* 84(4):285-295.

- Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vazquez M., Dahme E. & Pospischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 30:327-332.
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Mosier D., Sur J.H., Osório F.A., Kennedy G. & Weiss M.L. 1997. Neurophatology of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.* 117:295-310.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. & Rock D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77:10339- 10347.
- Dezengrini R., Weiss M., Torres F.D., Oliveira M.S., Furian A.F., Mello C.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2009. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits which correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J. Neurovirology.* 15:153-163.
- 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.
- Flores E.F. & Donis R. 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine virus diarrhea virus (BVDV) due to a block in viral entry. *Virology* 208:565-575.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Dezengrini R., Almeida R.S., Spilki F. & Roehe P.M. 2009. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 29:1-16.
- Kahrs R.F. 2001. Infectious bovine rhinotrachitis and infectious pustular vulvovaginitis, p.159-170. In: Kahrs R.F. (Ed.), *Viral disease of cattle*. Iowa State University Press, Ames.
- Lindner A., Ambrosius H. & Liebermann H. 1993. The development of an ELISA for the detection of antibodies against type 5 bovine herpesvirus (BHV-5) in sheep sera. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 100:440-442.
- Mayer S.V., Quadros V.L., Vogel F.S.F., Winkelmann E.R., Arenhart S., Weiblen R. & Flores E.F. 2006. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:335-343.
- Meyer G., Lemaire M. & Lyaku J. 1996. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.* 5:27-40.
- Meyer G., Lemaire M., Ros K., Belak A., Gabriel D., Cassart E., Coignoul S., Belak S. & Thiry E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infection of calves with bovine herpesvirus 5: comparison with bovine herpesvirus 1. *Arch. Virol.* 146:633-652.

- Perez S.E, Bretschneider C., Leunda M.R., Osorio F.A., Flores E.F. & Odeón A.C. 2002. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.* 39:437-444.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Riet-Correa F., Vidor T., Schild A.L. & Méndez M.C. 1989. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por Herpes Vírus Bovino-1. *Pesq. Vet. Bras.* 9:13-16.
- Rissi D.R., Rech R.R., Flores E.F., Kommers G.D. & Barros C.L. 2007. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. *Pesq. Vet. Bras.* 27:251-260.
- Salvador S.W.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M. & Osorio 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.
- Santos C.M.B., Anziliero D., Bauermann F.B., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E (gE), thymidine kinase (TK) and both, gE/TK. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):319-325
- Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Canto M.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M. & Souza R.S. 1999a. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Revta Bras. Microbiol.* 30:22-31.
- Silva A.M., Weiblen R., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Sur H.J., Osorio F.A. & Flores E.F. 1999b. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Microbiol.* 66:89-99.
- Silva S.C., Brum M.C., Weiblen R., Flores E.F. & Chowdhury S.I. 2010. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43:150-159.
- Studdert M.J. 1990. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 126:21-22.
- Vogel F.S.F., Lima M., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V., Mazzutti K.C. & Arenhart S. 2002. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1, 5). *Ciência Rural* 43:1619-1621.
- 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.

Weiblen R., Barros C.S.L., Canabarro T.F. & Flores E.F. 1989. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* 25:666-667.

Quadro 1. Excreção viral em secreções nasais durante infecção aguda em cordeiros inoculados com herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e título de anticorpos (Ac) neutralizantes aos 30 dias pós-inoculação viral (dpi).

Animal	Excreção viral dpi												Título Ac neutralizantes (30dpi)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 - 15	
1	3,0 ^a	5,1	2,1	3,8	1,9	3,8	- ^b	-	-	-	-	-	64
2	3,3	4,0	2,5	2,0	+ ^c	2,7	-	-	-	-	-	-	64
3	4,7	5,5	3,7	2,8	4,9	3,9	-	-	-	-	+	-	64
4	2,3	5,1	2,5	2,1	3,1	1,9	-	-	-	-	-	-	128
5	3,0	3,8	2,3	1,9	2,7	2,0	1,9	-	-	-	-	-	32
6	4,0	4,0	3,3	2,7	4,7	3,7	1,9	-	-	-	-	-	32
7	3,7	4,0	4,1	3,3	2,9	2,9	1,9	+	+	-	-	-	16
8	3,3	3,7	4,0	2,1	2,8	2,9	+	+	-	-	-	-	64
11	4,8	4,0	+	+	2,1	2,1	+	2,0	+	-	+	-	16
12	2,5	4,3	4,9	3,3	3,9	-	-	-	-	-	-	-	32
13	3,8	4,5	3,0	1,9	3,3	1,9	-	-	-	-	-	-	64
14	2,1	2,7	+	2,1	3,1	1,9	-	-	-	-	-	-	32
15	2,9	3,9	3,1	2,3	1,9	-	-	-	-	-	-	-	32

^aTítulo viral expresso 10^x DICC₅₀/mL; ^b- Negativo para vírus; ^c+ Positivo para vírus

Quadro 2. Detecção de DNA viral por PCR durante infecção latente (30 dias após a inoculação) em secções do encéfalo de ovinos infectados experimentalmente com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).

Animal	Secção tecidual					
	BO	CC	TA	PO	CB	TG
3	^a +	+	^b -	-	+	+
7	+	-	-	+	+	+
13	+	-	-	-	-	+
14	+	-	-	+	-	+
15	+	-	-	-	-	+

BO = bulbo olfatório; CC = córtex cerebral; TA = tálamo; PO = ponte; CB = cerebelo; TG = gânglio trigêmeo. ^a + Positivo para DNA viral; ^b - Negativo para DNA viral.

Quadro 3. Excreção viral em secreções nasais após administração de corticoides (dpt) e título de anticorpos (Ac) neutralizantes após tratamento com dexametasona (Dx) ou flumetasona (FluM) em ovinos inoculados com herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).

Corticoide	Animal	Excreção viral dpi							Título Ac neutralizantes 0 dpt	Título Ac neutralizantes 15 dpt
		0-2	3	4	5	6	7	8		
Dx	1	- ^a	2,1 ^b	2,7	2,8	1,9	+ ^c	-	4	16
	6	-	2,0	1,9	1,9	-	+	-	4	16
	8	-	-	-	-	-	-	-	8	2
	12	-	2,1	-	-	-	-	-	8	16
FluM	2	-	-	-	-	-	2,1	+	8	8
	4	-	-	-	-	+	2,0	+	32	64
	5	-	2,1	-	-	-	-	-	8	8
	11	-	-	-	-	-	-	-	8	4

^a - Negativo para vírus; ^b Título viral expresso em 10^x DICC₅₀/mL; ^c + Positivo para vírus

Quadro 4 . Detecção de DNA viral por PCR durante infecção latente (30 dias após a reativação) em diferentes secções do encéfalo de ovinos infectados experimentalmente com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).

Animal	Secção tecidual					
	BO	CC	TA	PO	CB	TG
1	+ ^a	- ^b	-	-	+	-
2	+	-	-	+	+	+
4	+	-	-	-	+	+
5	+	-	-	-	+	+
6	+	-	-	+	-	-

BO = bulbo olfatório; CC = córtex cerebral; TA = tálamo; PO = ponte; CB = cerebelo; TG = gânglio trigêmeo. ^a + Positivo para DNA viral; ^b - Negativo para DNA viral.

3. CAPÍTULO 2

A thymidine kinase-deleted bovine herpesvirus 5 establishes latent infection but reactivates poorly in a sheep model

Gustavo C. Cadore¹, Marcelo Weiss¹, Deniz Anziliero¹, Mário C.S. Brum², Rudi Weiblen¹ and Eduardo F. Flores¹

Artigo publicado na *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(3):331-338, 2013.

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

²Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Uruguaiana, RS, Brasil.

Correspondence: E.F. Flores, DMVP/CCR/UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. Fax: +55-55-3220-8034. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

ABSTRACT.- Cadore G.C., Weiss M., Anziliero D., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2013. [A thymidine kinase-deleted bovine herpesvirus 5 establishes latent infection but reactivates poorly in a sheep model.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(3):331-338. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

The ability of thymidine kinase (*tk*)-deleted recombinant bovine herpesvirus 5 (BoHV-5 $tk\Delta$) to establish and reactivate latent infection was investigated in lambs. During acute infection, the recombinant virus replicated moderately in the nasal mucosa, yet to lower titers than the parental strain. At day 40 post-infection (pi), latent viral DNA was detected in trigeminal ganglia (TG) of all lambs in both groups. However, the amount of recombinant viral DNA in TGs was lower (9.7-fold less) than that of the parental virus as determined by quantitative real time PCR. Thus, *tk* deletion had no apparent effect on the frequency of latent infection but reduced colonization of TG. Upon dexamethasone (Dx) administration at day 40 pi, lambs inoculated with parental virus shed infectious virus in nasal secretions, contrasting with lack of infectivity in secretions of lambs inoculated with the recombinant virus. Nevertheless, some nasal swabs from the recombinant virus group were positive for viral DNA by PCR, indicating low levels of reactivation. Thus, BoHV-5 TK activity is not required for establishment of latency, but seems critical for efficient virus reactivation upon Dx treatment.

INDEX TERMS: BoHV-5; recombinant; TK; latency; qPCR.

RESUMO.- [Recombinante do herpesvírus bovino tipo 5 com deleção na timidina quinase estabelece infecção latente porém reativa ineficientemente em ovinos.] A capacidade de um recombinante do herpesvírus bovino tipo 5 com deleção no gene da timidina quinase (BoHV-5 $tk\Delta$) em estabelecer e reativar infecção latente foi investigada

em cordeiros. Durante a infecção aguda, o vírus recombinante replicou na mucosa nasal em títulos moderados, porém menores do que os da cepa parental. Aos 40 dias pós-infecção (pi) DNA viral latente foi detectado no gânglio trigêmeo (TG) de todos os cordeiros em ambos os grupos. No entanto, a quantidade de DNA do vírus recombinante nos TGs foi 9,7 vezes menor do que do vírus parental, segundo determinação por PCR em tempo real. Assim, a deleção do gene *tk* (timidina quinase) não produziu efeito aparente sobre a frequência da infecção latente, porém reduziu a colonização do TG. Após a administração de dexametasona (Dx) no dia 40pi, os cordeiros inoculados com o vírus parental excretaram partículas virais infecciosas, contrastando com a falta de infectividade nas secreções nasais dos animais inoculados com o vírus recombinante. Entretanto, alguns suabes nasais dos cordeiros do grupo do vírus recombinante foram positivos para o DNA viral por PCR, indicando baixos níveis de reativação. Assim, a atividade da enzima timidina quinase não é requerida para o estabelecimento de latência pelo BoHV-5, mas parece fundamental para reativação eficiente da infecção latente após tratamento com Dx.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BoHV-5, recombinante, TK, latência, qPCR.

INTRODUCTION

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is an enveloped DNA virus classified within the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* (Roizman et al. 1992). The agent is associated with meningoencephalitis in cattle, a disease frequently described in Argentina (Perez et al. 2003) and Brazil, where many outbreaks are reported every year (Salvador et al. 1998, Rissi et al., 2008). BoHV-5 is closely

related to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), the agent of bovine infectious rhinotracheitis and vulvovaginitis/balanoposthitis (Kahrs 2001). BoHV-5 is highly neurovirulent in cattle and in animal models, a property that distinguishes it from BoHV-1 (Belknap et al. 1994, Chowdhury et al. 1997, Vogel et al. 2003). Like other alphaherpesviruses, these viruses establish latent infections in sensory nerve ganglia and can be reactivated spontaneously or by corticosteroid administration (Rock 1994, Vogel et al. 2003).

The BoHV-5 genome is a linear double-stranded DNA molecule of approximately 138 kb in length and encodes at least 70 gene products (Delhon et al. 2003). By analogy with other alphaherpesviruses, approximately half of viral-encoded products are non-essential (NE) for virus replication in tissue culture (Delhon et al. 2003). Deletions of individual NE genes – especially the gene encoding the enzyme thymidine kinase (TK) - have been used to produce attenuated BoHV-1 strains for use in vaccines (Kit 1985, Chowdhury 1996, Kaashoek et al. 1996). Herpesvirus-encoded TK is an enzyme involved in the metabolism of deoxyribonucleotides, an activity necessary for viral DNA synthesis and genome replication in non-dividing cells such as neurons (Tenser 1991). Usually, *tk* gene deletion leads to deficient virus replication in neurons and reduced neurovirulence of human and animal alphaherpesviruses (Coen et al. 1989, Mengeling 1991, Tenser 1991, Ferrari et al. 2000). BoHV-1 mutants lacking TK activity are attenuated to different levels (Kit 1985, Chowdhury 1996, Kaashoek et al. 1996), and a *tk* deletion BoHV-5 mutant was shown to be attenuated for rabbits (Silva et al. 2010) and calves (Santos et al. 2011).

Although herpesvirus-encoded TK activity is required for virus replication in neurons, it is not necessary for the establishment of latency by human and animal alphaherpesviruses (Tenser et al. 1979, Coen et al., 1989, Volz et al. 1992, Kaashoek et al. 1996, Chen et al. 2004). In contrast, TK activity is required for efficient reactivation

such the ability of TK-defective viruses to reactivate latency is drastically reduced, if not abolished (Coen et al. 1989, Volz et al. 1992, Kaashoek et al. 1996, Ferrari et al. 1998, Chen et al. 2004). Regardless, some conflicting results have been reported, and reactivation of TK-negative pseudorabies virus (PRV, Mengeling 1991) and BoHV-1 mutants has been reported (Whetstone et al. 1992). In any case, it is generally accepted that TK-defective alphaherpesviruses do not reactivate – or reactivate poorly - from sensory nerve ganglia (Tenser et al. 1979, Coen et al. 1989, Chen et al. 2004).

Our group described the construction of a *tk*-deleted recombinant BoHV-5 strain (BoHV-5 $tk\Delta$) as a part of a vaccine project (Brum et al. 2010a). The recombinant was attenuated for calves and rabbits, yet it was capable of establishing latent infection in the trigeminal ganglia (TG) of both species (Santos et al. 2011, Silva et al. 2010). The recombinant virus reactivated poorly in calves upon dexamethasone (Dx) treatment (Santos et al. 2011) and did not reactivate in rabbits (Silva et al. 2010). In the present study, we conducted a more comprehensive study on the biology of latent infection by BoHV-5 $tk\Delta$. We used lambs as a model since rabbits are too susceptible to BoHV-5 neurological disease and most inoculated animals die during acute infection (Caron et al. 2002, Flores et al. 2009). In contrast, lambs are susceptible to acute and latent BoHV-5 infection yet and are relatively resistant to neurological disease (Silva et al. 1999, Cadore et al. 2011). In addition to investigate the latency-reactivation cycle, we used real time PCR (qPCR) to compare the amount of latent viral DNA in TGs of lambs inoculated with the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ versus the parental strain.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. Lambs were inoculated intranasally (IN) with the parental virus (BoHV-5 SV-507/99, n=14) or with the recombinant (BoHV-5 $tk\Delta$, n=14) and submitted

to clinical, virological and serological monitoring during acute infection. At day 40 post-inoculation (pi), 10 animals of each group were euthanized for tissue collection. Total DNA extracted from TGs was submitted to a nested-PCR for detection and real time quantitative PCR (qPCR) for quantification of latent viral DNA. The remaining lambs (n=4 from each group) were submitted to Dx treatment and monitored thereafter for virus shedding and seroconversion.

Viruses and cells. The recombinant virus lacking the *tk* gene (BoHV-5 $tk\Delta$) was constructed out of a well characterized Brazilian BoHV-5 strain (Brum et al. 2010a). The parental strain (SV-507/99) was isolated from a cow with neurological disease in Southern Brazil and had its entire genome sequenced (Delhon et al. 2003). All procedures of virus multiplication, isolation and serological tests were performed in a MDBK-derived cell line named CRIB (ATCC-CRL 11883). Cells were maintained in minimum essential medium (MEM, Invitrogen, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Brazil), 100 U/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin (Nutricell, Brazil). The two viruses were used at passage # 6 in CRIB cells.

***In vitro* growth kinetics.** Prior to animal inoculation, we investigated the ability of both viruses to replicate in cultured cells of ovine origin. The one step growth curve was performed in primary lamb testicle cells (passage # 8), using CRIB cells as controls, according to Brum et al.(2010a) . Cell monolayers in 6-well plates were inoculated with either virus at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 5 and the cells were further incubated for 2 h at 37°C to allow virus penetration. The inoculum was then removed, and the cells were washed twice with MEM and overlaid with fresh MEM supplemented with 5% fetal bovine serum. At intervals after virus inoculation (0, 6, 12, 18, 24 and 30 h) aliquots of culture supernatants were harvested and submitted to virus quantitation by limiting dilution. Virus titers were calculated according to Reed and

Muench (1938) and expressed as \log_{10} median tissue culture infectious dose per milliliter (TCID₅₀/ml).

Animals, virus inoculation and monitoring. Twenty eight Pollwarth lambs of both genders, aging 4 to 6 months, were randomly allocated in two groups of 14 animals each and inoculated with either virus (parental or recombinant). Each animal received an inoculum of 2 mL, divided in the two nostrils, containing a total dose of $10^{6.7}$ TCID₅₀/mL. After inoculation, animals were monitored clinically on a daily basis and nasal swabs for virus isolation and quantification were collected up to day 15 pi; blood for serology was collected at days 0 and 40 pi. At that day, 10 animals of each group were euthanized for tissue collection. TGs were collected aseptically and stored at -80°C until use. The remaining lambs (n= 4 for each group) were then submitted to five daily intramuscular administrations of dexamethasone (Dx, 0.2 mg/kg/day; Decadronal®, Aché, Brazil) and monitored as described for acute infection. Swabs for virus isolation and quantification were collected up to day 15 post Dx treatment (pDx) and blood for serology was collected at day 15 pDx.

All procedures of animal handling and experimentation were performed under veterinary supervision and according to recommendations by the Brazilian Committee on Animal Experimentation (COBEA; law # 6.638 of May 8, 1979). The animal experiments were approved by the Institutional Ethics and Animal Welfare Committee (UFMS, approval # 96/2010 of January 18, 2011).

Sample processing. Viral isolation and quantification in nasal swabs were performed in CRIB cells according to standard protocols (Diel et al. 2007). Virus titers in nasal secretions were expressed as \log_{10} TCID₅₀/ml. Sera obtained at days 0 and 40 pi; and at day 15 pDx were submitted to a standard virus neutralizing assay (VN) for neutralizing antibodies, testing two-fold dilutions of sera against 100-200 TCID₅₀ of virus (Diel et al.

2007). Geometric mean titers (GMT) of neutralizing antibodies of each group were calculated according to Thrusfield (2005).

DNA extraction and PCR. After cleaning, TGs were minced with a razor blade and submitted to total DNA extraction using phenol-chloroform protocol (Vogel et al. 2003). DNA extraction of nasal swabs was performed using DNAzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. After extraction, DNA was solubilized in Tris-EDTA (80 µL) and stored at -80°C until testing. DNA concentration was measured by ultra violet light (UV) absorbance at 260 nm. Total DNA was submitted to a nested PCR using two set of primers of the glycoprotein B (gB) amplified according Diel et al. (2007). External primers, used in first reaction were – forward: 5'-CCAGTCCAGGCAACCGTCAC-3' and reverse: 5'-CTCGAAAGCCGAGTACCTGCG-3'. The internal primers, used in second reaction were – forward: 5'-GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC-3' and reverse: 5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3'. The first PCR reaction amplifying a 444 bp DNA fragment and the second reaction results in a 294 bp amplicon. The PCR products were added with 3µL GelRed® (Biotium, Inc., CA, USA) and analyzed under UV light after electrophoresis in an 1% agarose gel. Total DNA extracted from the brain of a control non-infected lamb, and from a calf with acute BoHV-5 infection was used as negative and positive controls, respectively.

For swabs, nasal secretions obtained from an uninfected lamb were tested in parallel as negative control. PCR for *tk* gene applied on nasal swabs used the following primers: forward: 5'-GACGTCGTGACCCTCGTGTTTG-3' and reverse: 5'-TAGGAAGGCGCACGTGTTCG-3'. The PCR amplifying a 285 pb DNA fragment and was carried out in a 25µL volume containing 1X PCR buffer, 10mM deoxyribonucleotides, 10mM of each primer, 2.5 units Taq polymerase, 1.5mM MgCl₂,

10% DMSO, and 100ng DNA as template. The PCR conditions consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 60°C for 30 s and 72°C for 45 s, and final extension of 10 min at 72°C. The PCR to gB gene was the same as described previously.

Real-time PCR (qPCR). Total DNA extracted from TGs was submitted to a qPCR analysis to estimate and compare the amount of latent DNA in lambs infected with the parental and recombinant virus. The qPCR was conducted in an StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA) with Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Two sets of primers were used: one set for ovine GAPDH gene (forward: 5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCC-3' and reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3') and another for BoHV-5 glycoprotein G (gG) gene (forward: 5'-GCCCTGGTTGTCCTAGACATG-3' and reverse: 5'-CGTTCCCCGTGCAGTTAAAG-3'). The qPCR was performed in 25 µL volume reaction containing, 12.5 µL of SYBR® Green PCR Master Mix, 5mM of each primer and 100ng template of total DNA. Thermal cycling parameters (10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C) were used to amplify each reaction. All samples were run in duplicates and melting-curve analysis was performed to verify product identity. Before the relative quantification analysis, a computer program (LinRegPCR, version 11.4) was used to normalize the Ct results with the amplification efficiency. For quantification analysis just samples that had PCR efficiency next to 2 (± 0.1) and correlation next to 1 (± 0.001) was used. The relative DNA quantification across treatments was evaluated using the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak & Schmittgen 2001). Briefly, the ΔC_t is calculated as the difference between the Ct of the investigated gene and the Ct of GAPDH in each sample (Bustin et al. 2009). The $\Delta\Delta C_t$ of each investigated gene is calculated as the difference between the ΔC_t in each treated sample

and the ΔCt of the sample with lower gene expression (higher ΔCt). The fold change in relative genomic DNA concentrations was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. The qPCR was made in samples from animals experimentally inoculated with the two virus, wild type virus (SV-507/99) and *tk* gene deleted virus (BoHV-5*tk* Δ) using TG tissue of the day 40 pi.

Statistical analysis. The length and titers of virus shedding of both groups were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. Then, the results from the qPCR were analyzed using ANOVA test. All analyses were performed using JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC) and a $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data are presented as mean \pm Standard Error Minimum (SEM).

RESULTS

One step growth curve

As the recombinant virus was amplified and characterized in bovine cells (MDBK), before inoculation in lambs we investigated its ability to replicate in ovine cells. The one step growth curve experiment performed in primary lamb testicle cells demonstrated that the recombinant BoHV-5*tk* Δ replicated to a similar titer and with similar kinetics to those of the parental virus (Fig.1). Similar titers and kinetics were also observed in CRIB cells, a MDBK-derived cell line. Thus, a possible impairment in replicating in lambs would not be due to a gross defect of replication in ovine cells.

Acute infection

The main virological and serological findings following inoculation of lambs with the parental virus (SV-507/99) and recombinant (BoHV-5*tk* Δ) are presented in

Table 1 and Figure 2. Inoculated lambs did not show systemic signs during acute infection. Body temperature remained within normal limits; food consumption and alertness were unaffected. Four of five lambs of both groups presented a mild, transient serous nasal secretion between days 2 to 6 pi. Lambs inoculated with SV-507/99 shed virus in nasal secretions up to days 9 to 12 pi, with a mean period of excretion of 11.1 days. Lambs inoculated with the recombinant BoHV-5*tk*Δ, in general, shed virus for a shorter period of time ($p < 0.05$). Virus shedding by these lambs extended up to days 6 to 12, with an average of 8.5 days. Mean virus titers shed in nasal secretions are presented in Fig. 2. Virus shedding peaked at day 1 pi (parental virus) and 2 pi (recombinant), and the highest titers were observed at day 4 pi for SV-507/99 ($10^{5.9}$ TCID₅₀/ml) and 2 pi for BoHV-5*tk*Δ ($10^{5.1}$ TCID₅₀/ml). Virus titers were also significantly higher in secretions of lambs inoculated with the parental virus, noticeably at day 1 pi and between days 4 at 9 pi ($p < 0.01$; Fig.2). Most lambs inoculated with the parental and recombinant strains developed neutralizing antibodies at day 40 pi (Table 1). The geometric mean titer (GMT) of the parental group (2.36) was higher than the GMT of the group BoHV-5*tk*Δ (1.90).

Taken together, these results demonstrate that the recombinant BoHV-5*tk*Δ retained the ability to replicate in the nasal mucosa of lambs. The magnitude and duration of virus replication and shedding, however, were reduced comparing to the parental strain. In other words, *tk* deletion resulted in a moderate reduction in the replication efficiency of the recombinant virus.

Latent infection

No infectious virus was detected in nasal swabs collected from lambs inoculated with either strain at day 40 pi, demonstrating that acute virus replication had ended.

Nested-PCR examination of total DNA extracted from TGs revealed the presence of viral DNA in the ganglia of all inoculated lambs, regardless the group (data not show). No infectious virus was detected in these portions upon three passages of tissue homogenates in CRIB cells, confirming the status of latent infection. These results demonstrated that the parental virus and the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ established latent infection with the same frequency in the TGs of inoculated lambs. In other words, *tk* deletion (and the reduced acute replication that ensued) apparently did not adversely affect the ability of the recombinant to establish latent infection in nerve ganglia of lambs.

As acute replication of the recombinant virus in the periphery was reduced compared to the parental virus, we then sought to compare the amount of latent viral DNA present in TG of both groups. This approach would determine whether *tk* deletion would affect the efficiency of colonization of the ganglia with latent DNA. To this end, we used a real time qPCR to quantitate wild type and recombinant latent DNA in the TGs. The results presented in Figure 3 show that the amount of recombinant virus DNA in TGs of 10 lambs was approximately 9.7-fold lower than the amount of parental virus DNA in the respective 10 animals. Thus, although the recombinant was still able to consistently colonize the TGs, the overall amount of latent DNA was highly reduced ($p < 0.001$) compared to the parental strain. In other words, *tk* gene deletion did not affect the ability of the recombinant to establish latency but it did reduce the efficiency of colonization of TGs with latent viral DNA.

Reactivation of latent infection

Following Dx administration - starting at day 40 pi -, all four lambs inoculated with parental strain shed infectious virus in nasal secretions (mean duration = 5 days [4-

6]) (Table 2). Shedding was first detected at day 3 and lasted up to day 9 pDx in one lamb. The peak in virus titers was observed at days 5 and 6 pDx, with titers reaching $10^{4.1}$ TCID₅₀/mL. No systemic or neurological signs were recorded in these animals. In contrast, nasal secretions from BoHV-5*tkΔ*-inoculated lambs were negative for infectivity upon virus inoculation in cell cultures (Table 2). These results indicated lack of reactivation by the recombinant virus since no infectious virus was recovered from nasal swabs.

As to further investigate reactivation of the recombinant virus, nasal swabs collected after Dx treatment, were submitted to a PCR for a target sequence within the gB gene. Surprisingly and contrasting with negative results in virus isolation, swabs of 3 out of 4 lambs were positive for viral DNA (Table 2). Two of these animals (# 10 and 11) were positive in only one collection (days 7 and 8 pDx, respectively); animal # 6 yielded positive results in four days.

An additional PCR designed to amplify a genome region contained within the *tk* deletion was then used to discard a possible cross-contamination with the parental virus. This PCR confirmed that the viral DNA present in swabs was indeed that of the recombinant virus (Fig.4). These results contrasted with the results of virus isolation and indicated reactivation of the recombinant virus.

The discrepant results of virus isolation and PCR in these samples may reflect a low sensitivity of our virus isolation protocol and/or virus neutralization by antibodies present in nasal secretions. In any case, these results demonstrate that the recombinant BoHV-5*tkΔ* was able to reactivate - even at very low levels - following Dx treatment. Hence, TK activity seems not to be absolutely required for reactivation of latent infection by BoHV-5 in lambs.

DISCUSSION

Our results demonstrate that BoHV-5 TK activity is not essential for the establishment of latent infection, but is important for efficient colonization of nerve ganglia with latent viral DNA. The recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ colonized the TGs with the same frequency, yet with approximately 9.7-fold less latent viral DNA than did the parental strain. Low level of reactivation of BoHV-5 $tk\Delta$ was detected after Dx treatment, indicating that the enzyme activity is important - but not essential - for reactivation in lambs. As these results were obtained in lambs, they need to be validated in the natural hosts.

The ability of the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ to replicate in cell culture was not adversely affected (Fig. 1), as previously described in bovine and rabbit cells (Brum et al. 2010b, Silva et al. 2010). Replication of BoHV-5 $tk\Delta$ in the nasal mucosa of lambs, however, was significantly reduced (Table 1, Fig.2), confirming previous observations in rabbits (Silva et al. 2010) and calves (Santos et al. 2011) and extending previous observations with *tk*-deleted PRV and BoHV-1 strains in pigs and calves, respectively (Kaashoek et al. 1996, Ferrari et al. 1998). Indeed, TK-defective PRV, BoHV-1 and BoHV-5 usually show a reduced ability - to various extents - to replicate in peripheral tissues compared to TK positive counterparts (Kaashoek et al. 1996, Ferrari et al. 1998, 2000, Silva et al. 2010, Santos et al. 2011).

Although the recombinant replicated to lower titers than the parental strain in the nose during acute infection, it was still able to establish latent infection in all inoculated animals. These data would suggest that *tk* deletion - in spite of reducing acute virus replication at periphery - did not drastically reduce the ability of the virus to establish

latency. However, qPCR analysis showed a 9.7-fold reduction in the amount of recombinant virus DNA in TGs compared to the parental strain. Thus, *tk* deletion did not abolish the ability of the virus to establish latency, but resulted in a reduced colonization of TGs. We hypothesize that the reduced colonization of TGs with BoHV-5 $tk\Delta$ was predominantly a consequence of the decreased virus replication/load in the nose during acute infection rather than due to a reduced ability to replicate in neurons prior to the establishment of latent infection. Conceivably, a deficient virus replication during primary infection would result in reduced virus loads to invade the nervous system and colonize the nerve ganglia. Previous studies with HSV-1 in mouse models have shown that the establishment of latent infection by TK-defective mutants was 6- to 50-fold reduced comparing to the wildtype strains, as ascertained by the total of viral genomes, latently infected neurons and neurons expressing the latency related transcripts (Coen et al. 1989, Katz et al. 1990, Thompson & Sawtell 2000, Chen et al. 2004). On the other hand, slight or pronounced reduction in virus replication during acute infection had no apparent effect on the ability of the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ to produce latency in calves and rabbits (Silva et al. 2010, Santos et al. 2011) and of TK-defective PRV strains to establish latent infection in young pigs (Mengeling et al. 1992, Volz et al. 1992). Thus, lack of viral TK activity would reduce replication at peripheral sites but not to an extent that would abolish the ability to establish latent infection. Hence, viral TK activity is important for efficient acute replication in peripheral tissues which, in turn, would directly influence the level of colonization of ganglia with latent DNA.

The absence of infectious recombinant virus in nasal secretions following Dx treatment was somehow expected and would meet the general concept that TK-defective human and animal alphaherpesviruses are severely impaired in reactivating

latent infection (Coen et al. 1989, Tenser et al. 1989, Ferrari et al. 2000, Chen et al. 2004). Whether the absence of infectious virus was derived from an inherent inability of BoHV-5 $tk\Delta$ to reactivate or a consequence of the reduced colonization of TGs, or a combination of both, is unclear. In a mouse model, tk -negative HSV mutants did not reactivate even when their latent viral loads were comparable to those of the parental strains, indicating that reduced colonization of nerve ganglia does not suffice to explain failure to reactivate (Chen et al. 2004).

The role of alphaherpesvirus-encoded TK activity in virus reactivation is far more controversial. A number of studies have shown that truly TK negative HSV mutants derived from laboratory strains do not reactivate from nerve ganglia (Tenser & Edris 1987, Coen et al. 1989, Tenser et al. 1996, Chen et al. 2004), yet some mutants derived from clinical isolates might reactivate inefficiently (Horsburgh et al. 1998, Griffiths et al. 2003). Conflicting findings have also been reported for BoHV-1 and PRV tk deletion mutants, and both reactivation (Mengeling et al. 1992, Whetstone et al. 1992) and lack of reactivation have been reported (Mengeling 1991, Kaashoek et al. 1996, Ferrari et al. 2000). Most of these discrepancies likely reflect differences in virus species, strains, animals (natural hosts versus laboratory models) and experimental procedures (e.g. *in vivo* versus *in vitro* reactivation). Regardless, the general concept is that herpesvirus TK activity is crucial for efficient reactivation such truly tk -null mutants do not reactivate - or reactivate very poorly - from nerve ganglia (Coen et al. 1989, Tenser et al. 1996, Chen et al. 2004).

The detection of BoHV-5 $tk\Delta$ DNA by PCR in a few nasal swabs after Dx treatment indicated that some level of reactivation did occur. Although this is an unusual event for many tk negative alphaherpesviruses examined to date, low level of Dx-induced reactivation was also observed for this recombinant in calves (Santos et al.

2011). Along this line, viral TK activity as low as 0.09% of the wt levels appeared sufficient to support low levels of reactivation of *tk* negative HSV mutants in a mouse model (Besecker et al. 2007). Taken together, these data demonstrate that BoHV-5 Δtk is severely, but not completely impaired, in its ability to reactivate latent infection.

Trying to reconcile these findings, we hypothesize that the recombinant BoHV-5 Δtk DNA might present a residual ability to reactivate latent infection in neural tissue. It is also possible that reactivation of the recombinant occurred in lymphoid tissue, a secondary site of latency/persistence of PRV (Wheeler & Osorio 1991), BoHV-1 (Inman et al. 2002) and BoHV-5 (Cadore G. unpublished observations). Reinforcing the second hypothesis, latent BoHV-1 present in tonsils of latently infected calves was shown to reactivate and lead to productive virus replication upon Dx treatment and explant cultures *in vitro* (Inman et al. 2002, Perez et al. 2002). Either hypotheses would only be supported by a clear demonstration that latent BoHV-5 Δtk DNA present in nerve ganglia and/or in lymphoid tissue is reactivatable upon corticosteroid treatment.

Lastly, the clear demonstration that virus undetectable by virus isolation may be present in secretions of animals submitted to corticosteroid treatment recommends a reexamination of the indicators of virus reactivation in studies of alphaherpesvirus reactivation. As small amounts of virus may be rendered non-infectious by neutralizing antibodies present in secretions (Pastoret & Thiry 1985), the absence of infectivity should not be taken as the sole and definitive proof of lack of reactivation.

In summary, our results demonstrated that BoHV-5 encoded TK activity is not required for the establishment of latent infection, but is necessary for efficient colonization of TGs (likely through enhanced replication in peripheral tissue) and is required for efficient virus reactivation in a lamb model. The presence of recombinant viral DNA in a few swabs collected after Dx treatment indicates that virus reactivation –

even at very low levels – took place. Whether reactivation occurred in TGs or in other neural or non-neural sites is uncertain.

REFERENCES

- Belknap E.B., Collins J.K., Ayers V.K. & Schultheiss P.C. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Pathol.* 31:358-365.
- Besecker M.I., Furness C.L., Coen D.M. & Griffiths A. 2007. Expression of extremely low levels of thymidine kinase from an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant supports reactivation from latently infected mouse trigeminal ganglia. *J. Virol.* 81(15):8356-8360.
- Brum M.C.S., Weiblen R., Flores E.F. & Chowdhury S.I. 2010a. 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.
- Brum M.C.S., Santos C.M.B., Weiblen R. & Flores E.F. 2010b. Selection and characterization of brivudin resistant bovine herpesvirus type 5. *Braz. J. Microbiol.* 41:124-132.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. & Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55(4):611-622.
- Cadore G.C., Anziliero D., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Reactivation and distribution of bovine herpesvirus 5 DNA in the brain of latently infected lambs. *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1090-1096.
- Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F.C., Irigoyen L.F., Roehle P.M., Odeon A. & Sur J.-H. 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* 84(4):285-295.
- Chen S.H., Pearson 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., Mosier D., Sur J.H., Osorio F.A., Kennedy G. & Weiss M.L. 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.* 117:295-310.
- Coen D.M., Kosz-Vnenchak M., Jacobson J.G., Leib D.A., Bogard C.L., Schaffer P.A., Tyler K.L. & Knipe D.M. 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants

- establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 86:4736-4740.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. & Rock D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77:10339-10347.
- Diel D.G., Almeida S.R., Brum M.C., 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.
- Ferrari M., Gualandi G.L., Corradi A., Monaci C., Romanelli M.G., Tosi G. & Cantoni A.M. 1998. Experimental infection of pigs with a thymidine kinase negative strain of pseudorabies virus. *Comp. Immunol Microbiol. Infect. Dis.* 21:291-303.
- 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., Weiblen R., Vogel F.S.F., Dezengrini R., Almeida S.R., Spilki F.R. & Roehe P.M. 2009. Experimental neuropathogenesis of bovine herpesvirus 5 infection in rabbits. *Pesq. Vet. Bras.* 29:1-16.
- Griffiths A., Chen S.H., Horsburgh B.C. & Coen D.M. 2003. Translational compensation of a frameshift mutation affecting herpes simplex virus thymidine kinase is sufficient to permit reactivation from latency. *J. Virol.* 77:4703-4709.
- Horsburgh B.C., Chen S.H., Hu A., Mulamba G.B., Burns W.H. & Coen D.M. 1998. Recurrent acyclovir-resistant herpes simplex virus in an immunocompromised patient: can strain differences compensate for loss of thymidine kinase in pathogenesis? *J. Infect. Dis.* 178:618-625.
- Inman M., Lovato L., Doster A. & Jones C. 2002. A mutation in the latency related gene of bovine herpesvirus 1 interferes with the latency-reactivation cycle of latency in calves. *J. Virol.* 76:6771-6779.
- Kaashoek M.J., Van Engelenburg F.A., Moerman A., Gielkens A.L., Rijsewijk F.A. & Van Oirschot J.T. 1996. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet. Microbiol.* 48:143-53.
- Kahrs R.F. 2001. Infectious bovine rhinotrachitis and infectious pustular vulvovaginitis, p.159-170. In: Kahrs. R. F. (Ed.), *Viral Disease of Cattle*. Iowa State University Press, Ames.
- Katz J.P., Bodin E.T. & Coen D.M. 1990. Quantitative polymerase chain reaction analysis of herpes simplex virus DNA in ganglia of mice infected with replication-incompetent mutants. *J. Virol.* 64:4288-4295.
- Kit S. 1985. Thymidine kinase. *Microbiol. Sci.* 2(12):369-375.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25(4):402-408.
- Mengeling W.L. 1991. Virus reactivation in pigs latently infected with a thymidine kinase negative vaccine strain of pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 120:57-70.

- Mengeling W.L., Lager K.M., Volz D.M. & Brockmeier S.L. 1992. Effect of various vaccination procedures on shedding, latency, and reactivation of attenuated and virulent pseudorabies virus in swine. *Am. J. Vet. Res.* 53:2164-2173.
- Pastoret P. & Thiry E. 1985. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8:35-42.
- Perez S.E., Bretschneider G., Leunda M.R., Osorio F.A., Flores E.F. & Odeon A.C. 2002. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.* 39:437-444.
- Perez S.E., Vagnozzi A., Sur J.H., Odriozola E., Campero C.M. & Odeón A.C. 2003. Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. *Revta Argent. Microbiol.* 35:6973.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Rissi D.R., Pierezan F., Silva M.S., Flores E.F. & Barros C.S. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:346-349.
- Rock D. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type-1. *Semin. Virol.* 5:233-240.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family Herpesviridae: An update. *Arch. Virol.* 123:432-445.
- 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.
- Santos C.M.B., Anzilliero D., Bauermann D., Brum M.C.C., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E (gE), thymidine kinase (TK) and both gE/TK. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):319-325.
- Silva A.M., Weiblen R., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Sur H.J., Osorio F.A. & Flores E.F. 1999. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Microbiol.* 66:89-99.
- Silva S.C., Brum M.C., Weiblen R., Flores E.F. & Chowdhury S.I. 2010. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43:150-159.
- Tenser R.B., Miller R.L. & Rapp F. 1979. Trigeminal ganglion infection by thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus. *Science* 205:915-917.
- Tenser R.B. & Edris W.A. 1987. Trigeminal ganglion infection by thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus after *in vivo* complementation. *J. Virol.* 61:2171-2174.
- Tenser R.B., Hay K.A. & Edris W.A. 1989. Latency-associated transcript but not reactivatable virus is present in sensory ganglion neurons after inoculation of thymidine kinase negative mutants of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 63:2861-2865.

- Tenser R.B. 1991. The role of herpes simplex virus thymidine kinase expression in pathogenesis and latency. *Intervirology*. 32:76-92.
- Tenser R.B., Gaydos A. & Hay K.A. 1996. Reactivation of thymidine kinase-defective herpes simplex virus is enhanced by nucleoside. *J. Virol.* 70:1271-1276.
- Thompson R.L. & Sawtell N.M. 2000. Replication of herpes simplex virus type 1 within trigeminal ganglia is required for high frequency but not high viral genome copy number latency. *J. Virol.* 74:965-974.
- Thrusfield M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. 3ed, Oxford, Blackwell Science. 610p.
- Vogel F.S., 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.
- Volz D.M., Lager K.M. & Mengeling W.L. 1992. Latency of a thymidine kinase-negative pseudorabies vaccine virus detected by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 122:341-348.
- Wheeler J.G. & Osorio F.A. 1991. Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 52(11):1799-1803.
- 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.

Table 1. Virus shedding in nasal secretions during acute infection and virus neutralizing titers at day 40 post inoculation (pi) in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5*tkΔ*.

Group	Animal #	Virus shedding													Virus neutralizing titers	
		Day post inoculation (pi)													Day pi	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13-15	0	40
SV-507/99	1	4.5 ^a	4.3	2.9	3.1	4.1	4.1	2.9	1.3	2.5	1.0	- ^b	-	-	<2	8
	2	5.1	2.5	2.9	3.6	4.5	3.5	2.9	1.5	-	-	-	-	-	<2	16
	3	4.7	4.3	3.8	5.9	4.8	3.7	2.9	0.9	+ ^c	0.9	-	1.0	-	<2	32
	4	3.1	4.0	4.0	4.1	3.7	4.1	4.5	2.1	-	-	0.9	-	-	<2	32
	5	4.7	4.0	3.5	5.0	4.6	4.9	4.9	2.7	3.3	2.9	-	0.9	-	<2	8
	6	5.3	4.9	4.1	4.6	5.0	5.0	4.6	3.7	2.0	1.0	-	1.5	-	<2	4
	7	3.9	4.0	4.1	3.6	3.9	3.5	2.9	2.1	1.9	0.9	-	1.0	-	<2	4
	23	4.8	4.8	4.0	4.6	4.7	4.1	4.1	3.1	2.9	2.8	-	0.9	-	<2	2
	24	5.1	4.0	2.6	3.6	4.1	4.5	3.3	1.0	1.9	0.9	-	1.3	-	<2	4
	29	4.6	5.0	4.0	4.1	3.1	4.3	3.0	1.5	+	0.9	-	0.9	-	<2	4
BoHV-5 <i>tkΔ</i>	8	1.0	3.0	2.1	2.9	1.9	-	1.0	-	-	1.0	-	-	-	<2	8
	9	2.0	3.5	3.9	2.3	2.7	2.6	2.1	0.9	1.3	-	-	-	-	<2	4
	10	2.5	2.5	3.0	2.3	1.9	3.5	-	-	-	-	-	-	-	<2	4
	11	2.3	4.5	3.1	2.9	4.4	3.1	2.0	1.9	1.9	0.9	-	1.3	-	<2	4
	12	3.3	3.9	3.7	2.1	2.0	1.9	0.9	-	-	-	1.1	-	-	<2	4
	13	3.0	3.6	3.5	4.1	2.0	3.3	2.6	1.9	-	-	-	-	-	<2	2
	14	3.0	4.6	2.9	2.1	3.1	2.6	1.9	1.0	1.1	-	+	-	-	<2	4
	20	2.7	5.1	3.1	3.5	3.3	3.1	2.0	-	-	-	2.3	-	-	<2	8
	25	1.9	4.7	3.9	3.1	4.0	+	1.9	-	-	-	1.0	-	-	<2	8
	30	2.5	3.0	2.9	4.1	4.6	3.3	2.0	-	-	1.1	-	-	-	<2	4

^a Positive sample. Viral titers expressed as log₁₀TCID₅₀/mL.

^b Negative sample after inoculation in cell culture.

^c Positive sample after second or third passage in cell culture (titer <10^{0.9}TCID₅₀/mL).

Table 2. Virus shedding in nasal secretions after dexamethasone (Dx) treatment and virus neutralizing titers at day 15 post Dx administration (pDx) in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5*tkΔ*.

Group	Animal #	Virus shedding in nasal secretions									Virus neutralizing antibody	
		Day after dexamethasone administration (pDx)									Day pDx	
		0-2	3	4	5	6	7	8	9	10-15	0	15
SV-507/99	1Dx	- ^a	2.0 ^b	1.3	+ ^c	+	1.8	1.3	-	-	8	16
	2Dx	-	-	-	1.6	1.8	1.9	2.0	-	-	32	16
	5Dx	-	-	1.3	3.5	+	+	1.0	-	-	32	32
	6Dx	-	-	-	4.1	3.5	2.5	2.6	1.5	-	8	8
BoHV-5 <i>tkΔ</i>	8Dx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	2
	10Dx	-	-	-	-	-	(+) ^d	-	-	-	4	4
	11Dx	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	4	4
	12Dx	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	2	2

^a Negative sample.

^b Positive sample. Viral titers expressed as log₁₀ TCID₅₀/mL.

^c Positive sample after second or third passage in cell culture (titer <10^{0.9}TCID₅₀/mL).

^d Samples negative by virus isolation – positive by nested-PCR.

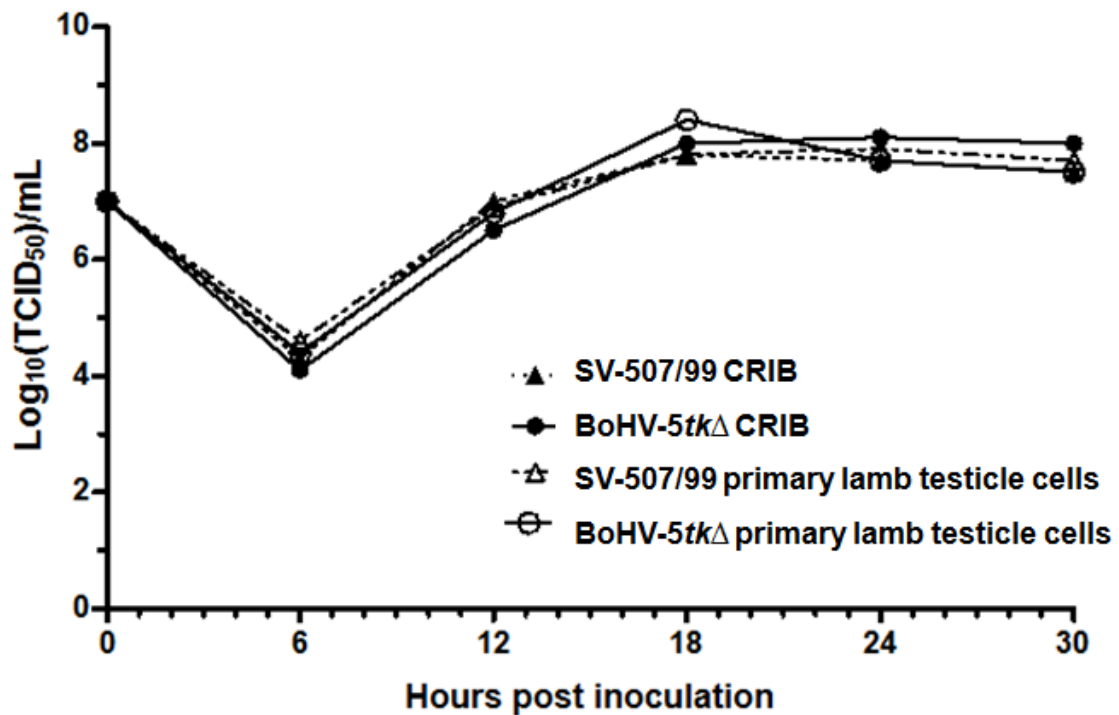


Fig.1. One step growth curve of replication of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 and recombinant (BoHV-5tkΔ) in CRIB cells and primary lamb testicle cells. Cells were inoculated with a m.o.i of 5 and aliquots of culture supernatants were collected at different intervals and submitted to virus quantitation by limiting dilution. The results represent the mean of two repetitions.

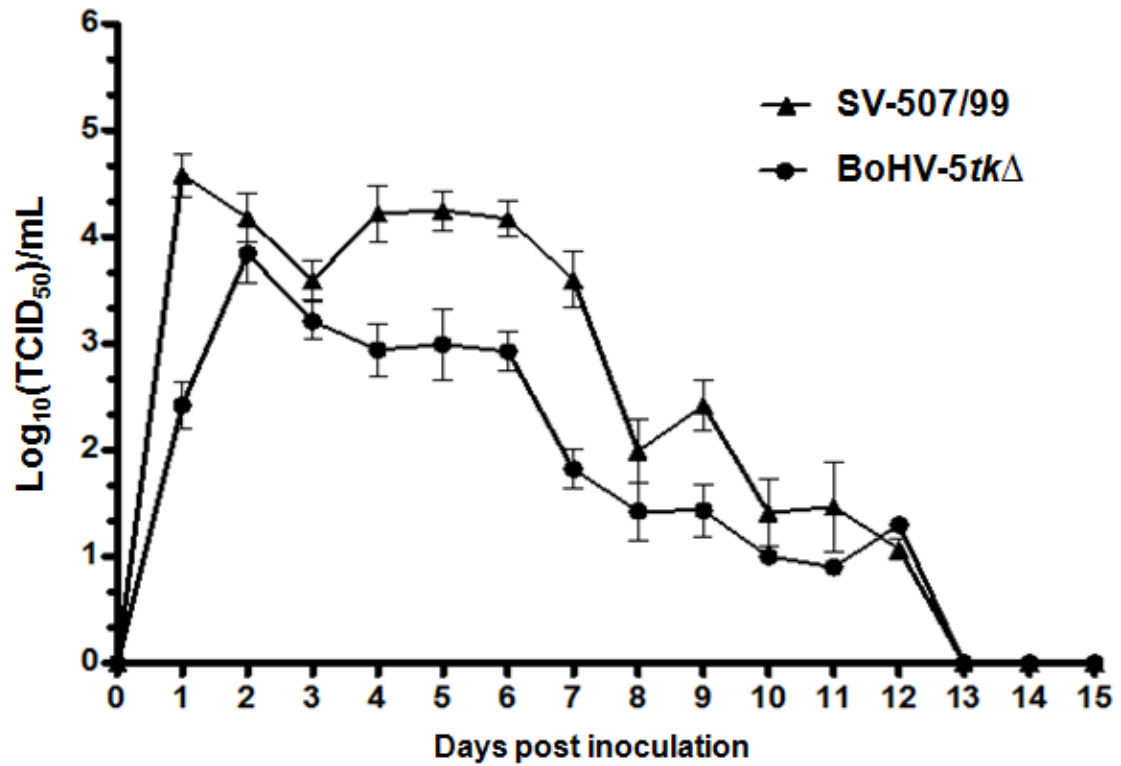


Fig.2. Virus shedding during acute infection. Mean virus titers in nasal secretions of lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5*tk*Δ. Data are presented as mean ± Standard Error Minimum (SEM).

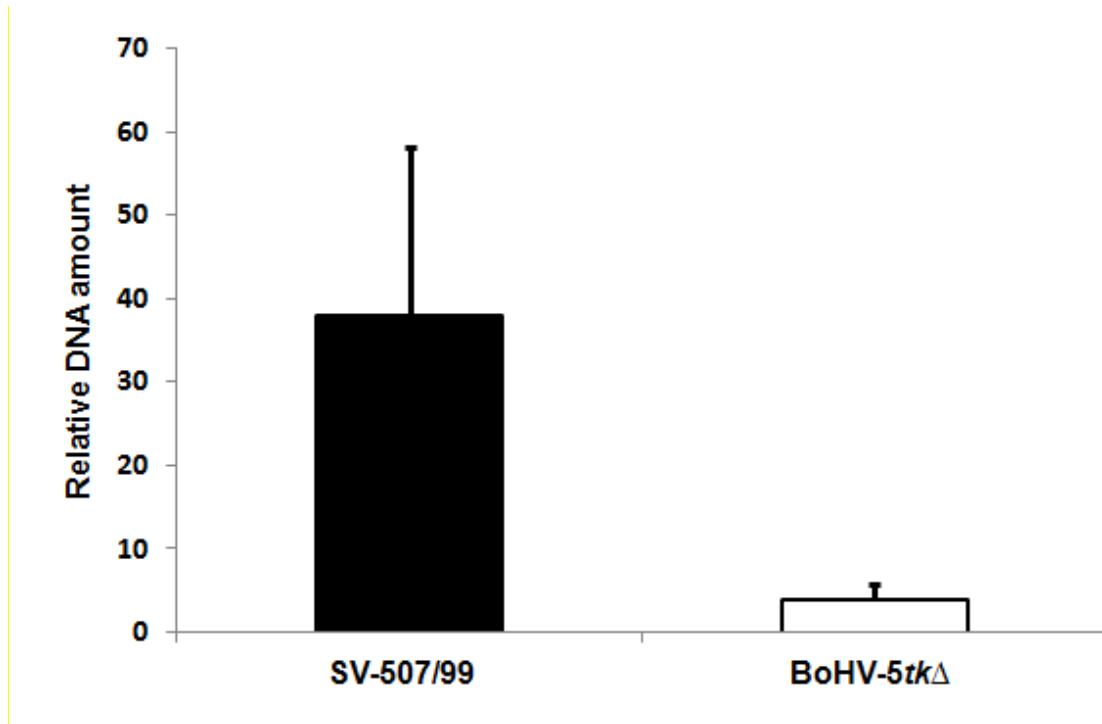


Fig.3. Relative viral DNA amount in trigeminal ganglia of lambs inoculated with bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) strain SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5tkΔ. The relative DNA quantification was determined using $\Delta\Delta C_t$ method and GAPDH as a housekeeping gene. Data are presented as mean \pm Standard Error Minimum (SEM).

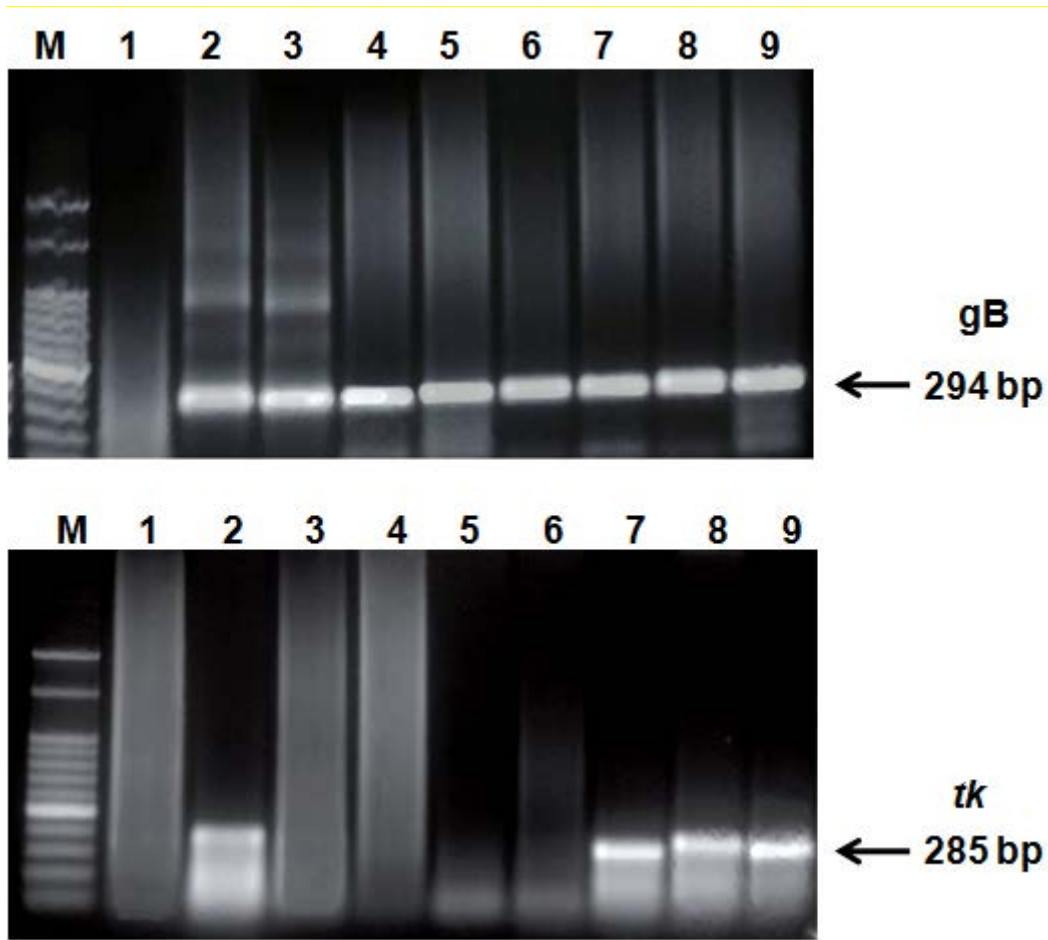


Fig.4. Detection of viral DNA by PCR in nasal swabs of lambs submitted to dexamethasone treatment. Top panel: nested PCR for glycoprotein B (gB) gene. Lower panel: PCR for thymidine kinase (*tk*) gene, where a positive reaction indicates the presence of entire *tk* gene. *Lane M*: Molecular weight marker; *lane 1*: CRIB mock; *lane 2*: BoHV-5 (SV-507/99); *lane 3*: BoHV-5*tk*Δ; *lanes 4, 5, 6*: swabs of animals inoculated with BoHV-5*tk*Δ; *lanes 7, 8, 9*: swabs of animals inoculated with parental virus (SV-507/99).

4. CAPÍTULO 3

Latency and reactivation of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) and a thymidine kinase-deleted BoHV-5 in neural and non-neural tissues of experimentally infected lambs

Gustavo C. Cadore¹, Gian Marcon¹, Rudi Weiblen¹ and Eduardo F. Flores¹

Artigo a ser submetido ao periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*

¹ Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Corresponding author: eduardofurtadoflores@gmail.com Phone/fax: +55 (55) 3220-8055.

ABSTRACT.- Cadore G.C., Marcon G., Weiblen R. & Flores E.F. 2013. [**Latency and reactivation of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) and a thymidine kinase-deleted BoHV-5 in neural and non-neural tissues of experimentally infected lambs.**]

Pesquisa Veterinária Brasileira XX (X):XXX-XXX. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) like other *alphaherpesviruses*, establishes latent infection in nerve ganglia. Reactivation from latency can occur after natural or corticosteroid-induced stress culminating in virus shedding and/or recurrent disease. The ability of BoHV-5 and a thymidine kinase (*tk*)-deleted recombinant (BoHV-5*tk* Δ) to establish and reactivate latent infection in nerve ganglia and lymphoid tissues was investigated in lambs. During acute infection, the recombinant virus replicated to moderate titers in the nose, yet to lower titers than the parental strain (BoHV-5 SV-507/99). In lambs euthanized at day 40 post-inoculation (pi), latent viral DNA was detected by PCR in the trigeminal ganglia (TG) and lymphoid tissues of all lambs in both groups (parental and recombinant). Upon dexamethasone (Dx) administration at day 40 pi, lambs inoculated with BoHV-5 shed infectious virus in nasal secretions, contrasting with absence of infectivity in secretions from lambs of the recombinant virus group. Nevertheless, some nasal swabs from the recombinant virus group were positive for viral DNA by PCR, indicating low levels of reactivation. Viral mRNA of glycoprotein B of BoHV-5, after Dx administration, was detected in TG, retropharyngeal lymph node and tonsils (palatine and pharyngeal) of lambs inoculated with the parental virus. In animals inoculated with BoHV-5*tk* Δ , gB mRNA was detected only in pharyngeal and palatine tonsils after Dx administration. These findings suggest that lymphoid tissues are sites of latency by BoHV-5 from which the virus can be

reactivated. These results demonstrate that, in spite of establishing latency in neural and non-neural sites (similarly to the parental virus), reactivation of the recombinant BoHV-5 Δtk appeared to occur only in non-neural sites. In anyway, the ability of a tk -deleted strain to reactivate latent infection deserves attention in the context of vaccine safety.

INDEX TERMS: deletion mutants, recombinant herpesvirus, site of latency, TK, animal model.

RESUMO.- [Latência e reativação do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e do BoHV-5 com deleção da timidina quinase em tecidos neurais e não neurais de cordeiros infectados experimentalmente.] O herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5), como outros *alfaherpesvirus*, estabelece infecção latente em gânglios nervosos. Reativação da latência pode ocorrer após estímulo natural ou pela administração de corticosteroides, culminando em excreção viral e/ou doença recorrente. A capacidade do BoHV-5 e de um recombinante com deleção da timidina quinase (BoHV-5 Δtk) em estabelecer e reativar a infecção latente em gânglios nervosos e tecidos linfóides foi investigada em cordeiros. Durante a infecção aguda, o vírus recombinante replicou em títulos moderados na cavidade nasal, porém em títulos menores do que a cepa parental (BoHV-5 SV-507/99). Em cordeiros eutanasiados no dia 40 pós inoculação (pi), o DNA viral latente foi detectado por PCR nos gânglios trigêmeos e em tecidos linfóides de todos animais em ambos os grupos (recombinante e parental). Após administração de dexametasona (Dx) no dia 40 pi, os cordeiros inoculados com o BoHV-5, excretaram vírus infecciosos nas secreções nasais, contrastando com a ausência de infectividade das secreções dos animais do grupo recombinante. Porém, alguns suabes nasais do grupo recombinante foram positivos para a presença de DNA viral por PCR, indicando baixos

níveis de reativação. Após administração de Dx, RNA mensageiro (mRNA) para a glicoproteína B do BoHV-5, foi detectado no gânglio trigêmeo, linfonodos retrofaríngeos e tonsilas (palatina e faríngea) dos cordeiros inoculados com o vírus parental. Nos animais inoculados com BoHV-5 $tk\Delta$, mRNA viral foi detectado apenas nas tonsilas palatina e faríngea. Estes resultados sugerem que tecidos linfóides são sítios de latência para o BoHV-5 e que o vírus pode ser reativado destes locais. Estes resultados demonstram que, apesar de se estabelecer latência em sítios neurais e não neurais (semelhante ao vírus parental), a reativação do recombinante BoHV-5 $tk\Delta$, parece ocorrer apenas em sítios não neurais. No entanto, a capacidade em reativar uma infecção latente de uma cepa tk -deletada, necessita especial atenção no contexto para a segurança de uma vacina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: mutantes deletados, herpesvírus recombinantes, sítios de latência, TK.

INTRODUCTION

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily (Roizman et al. 1992). BoHV-5 infection induces either a subclinical infection or disease of moderate severity in adult cattle (Cascio et al. 1999) and lethal encephalitis in young animals (Carrillo et al. 1983, Meyer et al. 2001). BoHV-5 and bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) are two closely related alphaherpesviruses and the major biological difference between these viruses seems to be the neurovirulent potential: BoHV-5 is highly neurovirulent for the natural hosts and for experimental animals (Chowdhury et

al. 1997, Vogel et al. 2003). Like other alphaherpesviruses, both viruses establish latency in sensory nerve ganglia, within trigeminal ganglia (TG) and can be reactivated spontaneously or by corticosteroid administration (Jones 2003, Vogel et al. 2003). Although ganglionic neurons are the main sites of latency for members of the subfamily *Alphaherpesvirinae*, latent or persistent infections can also occur in non-neural sites, for example, tonsils and lymph nodes. In this sense, BoHV-1 DNA is consistently detected in tonsils (Winkler et al. 2000) and peripheral blood cells during latent infection (Fuchs et al. 1999).

A well-equipped defense system is present in the skin and along many mucosal linings: the SALT (skin-associated lymphoid tissue) and MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) (Kuper et al. 1992, Liebler-Tenorio & Pabst 2006). Tonsils are major components of the MALT and the tonsils together form a ring of lymphoid tissue in the pharyngeal wall. Its location at the crossing of the digestive and respiratory tracts plays a key role in immunity as this is the site where vast amounts of foreign antigens enter the body during feeding and breathing (Casteleyn et al. 2011).

BoHV-1 and BoHV-5 genomes display the same genomic organization and share a nucleotide homology of approximately 85% (Delhon et al. 2003). Based on requirement for replication in cell culture, the genes of alphaherpesviruses have been classified into two groups, essential and non-essential (Schwyzer & Ackermann 1996). Deletions of individual non-essential genes, especially the gene encoding the enzyme thymidine kinase (TK), have been used to produce attenuated human and animal alphaherpesviruses (Coen et al. 1989, Mengeling 1991, Tenser 1994). Thymidine kinase is a cytosolic enzyme known to be involved in a DNA synthesis being responsible for introduction of deoxythymidine chains on DNA (Kit 1985). Herpesvirus-encoded TK is an enzyme involved in the metabolism of deoxyribonucleotides (dNTPs), an activity

necessary for viral DNA synthesis and genome replication in non-dividing cells such as neurons (Tenser 1994). Since *tk* gene is necessary for efficient virus replication in the central nervous system (CNS), it may represent an attractive target for attenuation (Brum et al. 2010) and a *tk* deletion BoHV-5 mutant was shown to be attenuated for rabbits (Silva et al. 2010), calves (Santos et al. 2011) and sheep (Cadore et al. 2013). Although herpesvirus-encoded TK activity is required for virus replication in neurons, it is not necessary for the establishment of latency by human and animal alphaherpesviruses (Coen et al. 1989, Volz et al. 1992, Kaashoek et al. 1996, Chen et al. 2004). In contrast, TK activity is required for efficient reactivation such the ability of TK-defective viruses to reactivate latency is drastically reduced, if not abolished (Coen et al. 1989, Kaashoek et al. 1996, Ferrari et al. 1998, Chen et al. 2004, Cadore et al. 2013).

In the present study, we conducted a more comprehensive study on the biology, latent infection and reactivation by BoHV-5 and a recombinant BoHV-5*tk*Δ. To investigate the latency-reactivation cycle, neural and non-neural tissues were tested in lambs inoculated with the recombinant BoHV-5*tk*Δ and the parental strain.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design. Lambs were inoculated intranasally (IN) with the parental virus (BoHV-5 SV-507/99, n=9) or with the recombinant (BoHV-5*tk*Δ, n=9) and submitted to clinical, virological and serological monitoring during acute infection. At day 40 post-inoculation (pi), three animals of each group were euthanized for tissue collection. Total DNA extracted from TGs, retropharyngeal lymph node and palatine

and pharyngeal tonsils were submitted to a nested-PCR for detection of latent viral DNA. The remaining lambs (n=6 from each group) were submitted to Dx treatment and monitored thereafter for virus shedding and seroconversion. Three animals of each group, were euthanized at day 3 pDx and at day 7 pDx for tissue collection.

Viruses and cells. The recombinant virus lacking the tk gene (BoHV-5 Δ tk) was constructed out of a well characterized Brazilian strain, BoHV-5 SV-507/99 (Brum et al. 2010). The parental virus SV-507/99 was isolated from a cow with neurological disease in southern Brazil and has been submitted to nucleotide sequencing of the entire genome (Delhon et al. 2003). All procedures of virus multiplication, isolation and serological tests were performed in a MDBK-derived cell line named CRIB (ATCC-CRL 11883). Cells were maintained in minimum essential medium (MEM, Invitrogen, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Brazil), 100 U/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin (Nutricell, Brazil). The two viruses were used at passage # 7 in CRIB cells.

Animals, virus inoculation and monitoring. Eighteen Pollwarth lambs of both genders, aging 4 to 6 months, were randomly allocated in two groups of 9 animals each and inoculated with either virus (parental or recombinant). Each animal received an inoculum of 2 mL, divided in the two nostrils, containing a total dose of $10^{6.8}$ TCID₅₀/mL. After inoculation, animals were monitored clinically every two days, nasal swabs for virus isolation and quantification were collected up to day 15 pi; blood for serology was collected at days 0 and 40 pi. At that day, 3 animals of each group were euthanized for tissue collection. The remaining lambs, were then submitted to three (3 animals each group) and five (other 3 animals each group) daily intramuscular administrations of dexamethasone (Dx, 0.2mg/kg/day; Decadronal®, Aché, Brazil) and monitored as described for acute infection. Swabs for virus isolation and quantification

were collected up to day 7 post Dx treatment (pDx) and blood for serology was collected at day 3 and 7 pDx. The Dx-treated animals were euthanized at days 3 and 7 pDx for TGs, tonsils and retropharyngeal lymph node collection. The TG of an acutely BoHV-5 infected calf was used as the positive control.

All procedures of animal handling and experimentation were performed under veterinary supervision and according to recommendations by the Brazilian Committee on Animal Experimentation (COBEA; law # 6.638 of May 8, 1979). Animal experiments were approved by the Institutional Ethics and Animal Welfare Committee (UFMS, approval # 96/2010 of January 18, 2011).

Sample processing. Viral isolation and quantification from nasal swabs were performed in CRIB cells according to standard protocols (Diel et al., 2007). Virus titers in nasal secretions were expressed as \log_{10} TCID₅₀/ml. Sera obtained at days 0 and 40 pi; and at day 3 and 7 pDx were submitted to a standard virus neutralizing assay (VN) for neutralizing antibodies, testing two-fold dilutions of sera against 100-200 TCID₅₀ of virus (Diel et al. 2007).

DNA extraction and nested-PCR. After cleaning, TGs, retropharyngeal lymph node and tonsils were minced with a razor blade and submitted to total DNA extraction using phenol-chloroform protocol (Vogel et al., 2003). DNA extraction of nasal swabs was performed using DNazol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. After extraction, DNA was solubilized in Tris-EDTA (50 µL) and stored at -80 °C until testing. Nucleic acids concentration was measured by ultra violet light (UV) absorbance at 260 nm. Total DNA was submitted to a nested PCR, using two set of primers of the glycoprotein B (gB) amplified according Diel et al. (2007). External primers, used in first reaction were – forward: 5'-CCAGTCCAGGCAACCGTCAC-3' and reverse: 5'-

CTCGAAAGCCGAGTACCTGCG-3' (444 bp). The internal primers, used in the second reaction were – forward: 5'-GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC-3' and reverse: 5'-GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG-3' (294 bp). The PCR products were added with 3 µL GelRed® (Biotium, Inc., CA, USA) and analyzed under UV light after electrophoresis in a 1% agarose gel. Total DNA extracted from the brain of a control non-infected lamb, and from a calf with acute BoHV-5 infection was used as negative and positive controls, respectively.

Nasal secretions obtained from an uninfected lamb were used as negative control. PCR for *tk* gene applied on nasal swabs were performed with the following primers: forward: 5'-GACGTCGTGACCCTCGTGTTTG-3' and reverse: 5'-TAGGAAGGCGCACGTGTTCG-3'. The PCR amplifying a 285 pb DNA fragment and was carried out in a 25 µL volume containing 1X PCR buffer, 10 mM dNTPs, 100 ng of each primer, 2.5 units Taq polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, and 100 ng DNA as template. The PCR conditions consisted of initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles at 94 °C for 45 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 45 s, and final extension of 10 min at 72 °C. The PCR to gB gene was the same as described previously.

RNA extraction, cDNA cloning and reverse transcriptase PCR (rt-PCR).

The TGs, tonsils and retropharyngeal lymph node were minced with a razor blade and submitted to total RNA extraction using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol, eluted in 30 µL of buffer and, stored at -80 °C. The DNA was removed by digestion with 1 U of Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at room temperature for 15 min. The first-strand cDNA synthesis from 8 µL of total RNA, extracted from TGs, retropharyngeal lymph node and tonsils, was carried out using a

SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using 100 µM oligo DT primers, according to the manufacturer's protocol. The rt-PCR step conditions primer sets were 50 min at 50 °C and 5 min at 85 °C. The complete absence of contaminating DNA within these RNA samples was verified by conducting PCR amplification on sample aliquots that were subjected to reverse transcription.

RESULTS

Acute infection

Inoculation of lambs with the parental virus (SV-507/99) and recombinant (BoHV-5*tk*Δ) resulted in efficient viral replication in the nasal mucosa and virus shedding in nasal secretions. Virological and serological findings are presented in Table 1. Inoculated lambs did not show systemic signs during acute infection. Rectal temperature remained within the normal limits, food consumption and alertness were unaffected. Lambs inoculated with SV-507/99 and BoHV-5*tk*Δ shed virus in nasal secretions up to day 8 pi. The highest titers (SV-507/99: 10^{5.6} TCID₅₀/ml; BoHV-5*tk*Δ: 10^{5.1} TCID₅₀/ml) were observed at day 2 pi for both viruses. All lambs inoculated with the parental and recombinant strains developed neutralizing antibodies at day 40 pi (Table 1).

These results demonstrate that the recombinant BoHV-5*tk*Δ retained the ability to replicate in the nasal mucosa of lambs and serology data demonstrated that virus replicated in all animals at sufficient levels to stimulate the immune response. The duration of virus shedding by the recombinant in most animals was similar, but in lower titers than the parental virus.

Latent infection

No infectious virus was detected in nasal swabs collected from lambs inoculated with either strain at day 40 pi, demonstrating that acute virus replication had ended. Nested-PCR examination of total DNA extracted from TGs and tonsils revealed the consistent presence of viral DNA of inoculated lambs, regardless the group. Viral DNA was also detected in retropharyngeal lymph nodes but less frequently than in other tissues (in 5 out of 9 animals inoculated with parental virus; 4 out of 9 lambs inoculated with recombinant virus, Table 2). No infectious virus was detected in tissue sections of the animals euthanized at day 40 pi (4wt, 5wt, 8wt, 13*tk*Δ, 17*tk*Δ and 18*tk*Δ) upon three passages in CRIB cells, confirming the status of latent infection. These results demonstrated that the lymphoid tissues, in addition to TGs, are sites of latent infection for parental virus and the recombinant BoHV-5*tk*Δ. Thus *tk* deletion apparently did not adversely affect the ability of the recombinant to establish latent infection in nerve ganglia and non-neural tissues of lambs.

Reactivation of latent infection

To determine whether the parental BoHV-5 and the recombinant would reactivate in neural and non-neural tissues, twelve latently infected lambs (BoHV-5 SV-507/99, n=6 or with the recombinant BoHV-5*tk*Δ, n=6), were treated with Dx starting at day 40 pi. Dx treatment resulted in virus shedding in nasal secretions in titers up to 10^{2.1} TCID₅₀/ml, in 3 out of 6 animals inoculated with parental virus, contrasting with absence of infectivity in secretions from lambs of the recombinant virus group (Table 3). Nevertheless, swabs of 4 out of 6 animals inoculated with the recombinant virus were positive for viral DNA by n-PCR, indicating low levels of reactivation (Table 3). An additional PCR designed to amplify a genome region contained within the *tk* deletion was then used to discard a possible cross-contamination with the parental virus,

confirming that the viral DNA present in swabs was indeed that of the recombinant virus (not shown). These results contrast with the virus isolation and indicate reactivation of the recombinant virus, even at low levels. Viral DNA was consistently detected in TG, palatine and pharyngeal tonsils of the lambs in both groups and, at lower frequency in retropharyngeal lymph node (Table 2). No systemic or neurological signs were recorded in animals subjected to Dx administration. Post-Dx treatment, 11 animals showed a two-fold or higher increase in virus neutralizing titers in serum collected at days 3 and 7 pDx (Table 3).

In order to investigate the presence of viral DNA in neural and non-neural tissues of inoculated lambs, total DNA was extracted from TG, retropharyngeal lymph node, palatine and pharyngeal tonsil collected prior to Dx treatment (day 40 pi) and 3 and 7 days later were submitted to nested PCR (n-PCR). The results of n-PCR performed on these tissues showed a consistent presence of viral DNA in TGs, palatine and pharyngeal tonsils (Table 2).

Viral gene expression in TGs and lymphoid tissues of lambs were tested post-Dx to investigate viral reactivation. The rt-PCR was performed with primers to detect glycoprotein B (gB) transcripts. Viral gene expression was examined at day 3 and 7 pDx. At day 3 pDx, five out of six animals showed gB mRNA expression, being three (3/3) of group inoculated with the parental virus and two (2/3) of the recombinant virus group. In lambs examined at day 7 pDx, reactivation was observed only in two (2/3) animals belonging to the group inoculated with the parental virus (Table 4). These results demonstrate that BoHV-5 (SV-507/99) and the recombinant BoHV-5*tkΔ* did establish latent infection in experimentally inoculated lambs and could be reactivated by Dx treatment in neural tissues (parental virus) and in lymphoid tissues (parental and recombinant virus).

DISCUSSION

This study demonstrated that, in addition to TGs, BoHV-5 and BoHV-5 $tk\Delta$ DNA persist in tonsils and in retropharyngeal lymph nodes of lambs after acute infection. Latent infection can be reactivated following Dx treatment. In TGs, reactivation occurred in animals inoculated with the parental virus but not with the recombinant, indicating a defect of the later in reactivating in neural tissue. In anyway, the ability of BoHV-5 to persist and to reactivate in non-neural tissues may be also important for virus transmission.

Acute and latent infections followed by virus reactivation and shedding in sheep have been demonstrated for BoHV-1 (Hage et al. 1997) and BoHV-5 (Belák et al. 1999, Silva et al. 1999). Although the recombinant virus replicated to lower titers than the parental strain in the nose during acute infection, it was still able to establish latent infection. Thus, *tk* deletion did not abolish the ability of the virus to establish latency, resulting in viral reactivation in lymphoid tissues but not in TGs. A deficient virus replication during acute infection would result in reduced virus loads to invade the nervous system and colonize the nerve ganglia. Regardless, the general concept is that herpesvirus TK activity is crucial for efficient reactivation such truly *tk*-null mutants do not reactivate - or reactivate very poorly - from nerve ganglia (Coen et al. 1989, Tenser et al. 1996, Chen et al. 2004). Studies with HSV-1 in mouse models have shown that the establishment of latent infection by TK-defective mutants was reduced comparing to the wild type strains (Katz et al. 1990, Chen et al. 2004). However, a reduction in virus replication during acute infection had no apparent effect on the ability of the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ to produce latency in rabbits, calves and lambs (Silva et al. 2010, Santos et al. 2011, Cadore et al. 2013). Thus, lack of viral TK activity did not

abolish the ability of the virus to establish latent infection and to reactivate in non-neural sites.

In this experiment, all lambs excreted significant amount of virus during acute infection and only three animals (inoculated with parental virus) re-excreted virus after Dx administration. The length and magnitude of virus shedding were slightly lower than those observed in calves inoculated with the parental BoHV-5 or the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ (Santos et al. 2011). In addition, none of the lambs developed neurological signs upon viral inoculation. In a previous experiments, one sheep inoculated with isolate of the BoHV-5 (EVI-88), developed fatal neurological disease, characterized by typical clinical signs and pathologic involvement on the CNS (Silva et al. 1999), and two calves inoculated with BoHV-5 SV-507/99, developed neurological signs and were euthanized during acute infection, and infectious virus was recovered from their brains upon inoculation in cell cultures (Santos et al. 2011).

This study demonstrated that latency was established in lymphoid tissues, in addition to neural tissues, in lambs inoculated with BoHV-5 and with the *tk*-negative recombinant. BoHV-1 DNA may also be found in tonsils of latently infected calves, demonstrating that viral DNA may persist in lymphoid cells long after acute infection (Winkler et al. 2000). Previous studies have demonstrated that Dx-induced reactivation leads to increase in HSV-1 neutralizing antibodies in rabbits (Perng et al. 1999) and BoHV-1 neutralizing antibodies in cattle (Jones et al., 1999). In this study, animals treated with Dx showed an increase in VN titers, indicating reactivation post Dx treatment. Although lymphoid cells and sensory neurons have different phenotypes, they are highly differentiated cells that might lack factors necessary for productive infection but that still have the potential to establish latency. The lack of transcription

factors or the presence of cellular factors that repress viral transcription is a significant factor during establishment of latency (Winkler et al. 2000, Jones 1998).

These findings demonstrate that the lymphoid tissues are sites for BoHV-5 latency from which the virus can be reactivated upon Dx treatment. Viral mRNA in TGs, tonsils and retropharyngeal lymph node was readily detectable by rt-PCR. Additionally, viral mRNA was found in tonsils in lambs inoculated with BoHV-5 $tk\Delta$, indicating a possible viral reactivation in these animals. Thus, BoHV-5 TK activity is not required for acute virus replication in the nose nor for the establishment of latency and tk -viruses can be reactivated, as from lymphoid tissues, yet tk seems critical for efficient virus reactivation upon Dx treatment. Nonetheless, the recombinant BoHV-5 $tk\Delta$ retains a capacity to reactivate latent infection in non-neural tissues.

In summary, our results demonstrated that the lymphoid tissues are sites for BoHV-5 latency from which the virus can be reactivated upon Dx treatment. Also, TK activity is not required for acute BoHV-5 replication in the nose nor for the establishment of latency, yet it seems critical for efficient virus reactivation from neural, but not from lymphoid tissues upon Dx treatment.

REFERENCES

- Belák K., Kucsera L., Ros C., Kulcsár G., Makranszki L., Soós T. & Belák S. 1999. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comp. Immunol. Microbiol.* 22:207-220.
- Brum M.C.S., 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.
- Cadore G.C., Anziliero D., Weiblen R. & Flores, E.F. 2011. Reactivation and distribution of bovine herpesvirus 5 DNA in the brain of latently infected lambs. *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1090-1096.

- Cadore G.C., Weiss M., Anziliero D., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores, E.F. 2013. A thymidine kinase bovine herpesvirus 5 deletion mutant establishes latent infection but reactivates poorly in a sheep model. *Pesq. Vet. Bras.* 33(3):331-338.
- Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Odeon A. & Sur J-H. 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* 84(4):285-295.
- Carrilo B.J., Pospischil A. & Dahme E. 1983. Pathology of bovine viral necrozing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.* 30:161-168.
- Cascio K.E., Belknap E.B., Schultheiss P.C. Ames, A.D. & Collins J.K. 1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Investig.* 11:134-139.
- Casteleyn C., Breugelmans S., Simoens P. & Van den Broeck W. 2011. The tonsils revisited: review of the anatomical localization and histological characteristics of the tonsils of domestic and laboratory animals. *Clin. Dev. Immunol.* 1:1-14.
- Chen S.H., Pearson 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., Lee B.J., Mosier D., Sur J.H., Osorio F.A., Kennedy G. & Weiss M.L. 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.* 117:295-310.
- Coen D.M., Kosz-Vnenchak M., Jacobson J.G., Leib D.A., Bogard C.L., Schaffer P.A., Tyler K.L. & Knipe D.M. 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:4736-4740.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. & Rock D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77:10339-10347.
- 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.
- Ferrari M., Gualandi G.L., Corradi A., Monaci C., Romanelli M.G., Tosi G. & Cantoni A.M. 1998. Experimental infection of pigs with a thymidine kinase negative strain of pseudorabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 21:291-303.
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F.S.F., Dezengrini R., Almeida S.R., Spilki F.R. & Roehe P.M. 2009. Experimental neuropathogenesis of bovine herpesvirus 5 infection in rabbits. *Pesq. Vet. Bras.* 29:1-16.

- Fuchs M., Hubert P., Detterer J. & Rziha H.J. 1999. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.* 37:2498-2507.
- Hage J.J., Vellema P., Schukken Y.H., Barkema H.W., Rijsewijk F.A.M., van Oirschot J.T. & Wentink G.H. 1997. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus-1 transmission. *Vet. Microbiol.* 57:41-54.
- Jones C. 1998. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv. Virus Res.* 51:81-133.
- Jones C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:79-95.
- Kaashoek M.J., Van Engelenburg F.A., Moerman A., Gielkens A.L., Rijsewijk F.A. & Van Oirschot J.T. 1996. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet. Microbiol.* 48:143-53.
- Katz J.P., Bodin E.T. & Coen D.M. 1990. Quantitative polymerase chain reaction analysis of herpes simplex virus DNA in ganglia of mice infected with replication-incompetent mutants. *J. Virol.* 64:4288-4295.
- Kit S. 1985. Thymidine kinase. *Microbiol. Sci.* 2(12):369-375.
- Kuper C.F., Koornstra P.J. & Hamelers D.M.H. 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today.* 13(6):219-224.
- Liebler-Tenorio E.M. & Pabst R. 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 37(3):257-280.
- Mengeling W.L. 1991. Virus reactivation in pigs latently infected with a thymidine kinase negative vaccine strain of pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 120:57-70.
- Meyer G., Lemaire M., Ros C., B elak K., Gabriel A., Cassart D., Coignoul E., B elak S. & Thiry E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.* 146:633-652.
- Perng G.C., Slanina S.M., Yuhkt A., Ghiasi H., Nesburn A.B. & Wechsler S.L. 1999. Herpes simplex virus type 1 serum neutralizing antibody titers increase during latency in rabbits latently infected with latency-associated transcript (LAT)-positive but not LAT-negative viruses. *J. Virol.* 73:9669-9672.
- Rock D. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type-1. *Semin. Virol.* 5:233-240.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family Herpesviridae: An update. *Arch. Virol.* 123:432-445.

- Santos C.M.B., Anzilliero D., Bauermann D., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E (gE), thymidine kinase (TK) and both gE/TK. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):319-325.
- Schwytzer M. & Ackermann M. 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Mic.* 53:17-29.
- Silva A.M., Weiblen R., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Sur H.J., Osorio F.A. & Flores E.F. 1999. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Microbiol.* 66:89-99.
- Silva S.C., Brum M.C.S., Weiblen R., Flores E.F. & Chowdhury, S.I. 2010. A bovine herpesvirus5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43:150-159.
- Tenser R.B. 1994. The role of herpes simplex virus thymidine kinase expression in pathogenesis and latency. p.68-86. In: *Pathogenicity of human herpesviruses due to specific pathogenicity genes.*
- Tenser R.B., Gaydos A. & Hay K.A. 1996. Reactivation of thymidine kinase-defective herpes simplex virus is enhanced by nucleoside. *J. Virol.* 70:1271-1276.
- Vogel F.S., 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.
- Volz D.M., Lager K.M. & Mengeling W.L. 1992. Latency of a thymidine kinase-negative pseudorabies vaccine virus detected by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 122:341-348.
- Winkler M.T.C., Doster A. & Jones, C. 2000. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J. Virol.* 74:5337-5346.

Table 1. Virus shedding in nasal secretions during acute infection and virus neutralizing titers at day 40 post inoculation (pi) in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5*tkΔ*.

Group	Virus titers in nasal secretions						Virus neutralizing antibody titers	
	Animal #	Day post inoculation (pi)					Day pi	
		2	4	6	8	10-14	0	40
SV-507/99	3 wt	5.6 ^a	4.0	2.1	0.9	- ^b	< 2	4
	4 wt	4.0	3.5	4.1	1.0	-	< 2	2
	5 wt	3.9	3.0	3.3	1.0	-	< 2	2
	7 wt	4.0	3.0	2.5	1.8	-	< 2	8
	8 wt	4.5	1.3	3.3	1.1	-	< 2	2
	9 wt	4.6	4.0	4.1	1.0	-	< 2	8
	10 wt	3.9	3.1	4.3	1.5	-	< 2	4
	11 wt	3.1	4.1	4.0	1.5	-	< 2	4
	12 wt	4.1	0.9	3.0	1.1	-	< 2	4
	BoHV-5 <i>tkΔ</i>	1 <i>tkΔ</i>	4.1	2.1	+ ^c	1.5	-	< 2
2 <i>tkΔ</i>		4.0	0.9	3.1	0.9	-	< 2	2
6 <i>tkΔ</i>		3.0	1.8	+	1.0	-	< 2	4
13 <i>tkΔ</i>		4.5	2.0	3.0	0.9	-	< 2	4
14 <i>tkΔ</i>		4.7	2.0	2.7	1.0	-	< 2	4
16 <i>tkΔ</i>		3.9	2.3	2.0	1.0	-	< 2	2
17 <i>tkΔ</i>		3.3	1.9	2.5	-	-	< 2	4
18 <i>tkΔ</i>		4.0	2.6	2.0	-	-	< 2	2
19 <i>tkΔ</i>		5.1	1.9	1.0	1.3	-	< 2	4

^a Positive sample. Viral titers expressed as log₁₀TCID₅₀/mL.

^b Negative sample after inoculation in cell culture.

^c Positive sample after second or third passage in cell culture (titer <10^{0.9}TCID₅₀/mL).

Table 2. Detection of viral DNA by PCR in neural and non-neural tissues of the lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5*tkΔ*.

Group	Animal #	Trigeminal Ganglia	Pharyngeal Tonsil	Palatine Tonsil	Retropharyngeal Lymph Node
SV-507/99	4 wt	+ ^a	+	+	- ^b
	5 wt	+	+	+	+
	8 wt	+	+	+	-
	7 wt	+	+	+	+
	9 wt	+	+	+	-
	11 wt	+	+	+	+
	3 wt	+	+	+	-
	10 wt	+	+	+	+
	12 wt	+	+	+	+
	BoHV-5 <i>tkΔ</i>	13 <i>tkΔ</i>	+	+	+
17 <i>tkΔ</i>		+	+	+	-
18 <i>tkΔ</i>		+	+	+	-
2 <i>tkΔ</i>		+	+	+	-
6 <i>tkΔ</i>		+	+	-	+
16 <i>tkΔ</i>		+	+	+	+
1 <i>tkΔ</i>		+	+	+	+
14 <i>tkΔ</i>		+	+	+	-
19 <i>tkΔ</i>		+	+	+	+

^a Positive sample by nested-PCR.

^b Negative sample by nested-PCR.

Table 3. Virus shedding in nasal secretions and virus neutralizing antibodies after dexamethasone (pDx) treatment in lambs inoculated with the parental bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) SV-507/99 or with the recombinant BoHV-5tkΔ.

Group	Virus titers in nasal secretions							Virus neutralizing antibody titers		
	Animal #	Day after dexamethasone administration (pDx)						Day pDx		
		0-2	3	4	5	6	7	0	3	7
SV-507/99	7 wt	- ^a	-					8	16	
	9 wt	-	-					8	16	
	11 wt	-	-					4	16	
	3 wt	-	-	-	2.1 ^b	1.7	-	4		32
	10 wt	-	-	-	1.3	1.5	1.3	4		8
	12 wt	-	+ ^c	2.1	1.9	1.3	-	4		16
BoHV-5tkΔ	2 tkΔ	-	(+) ^d					2	4	
	6 tkΔ	-	-					4	4	
	16 tkΔ	-	-					2	8	
	1 tkΔ	-	-	(+)	(+)	-	(+)	2		16
	14 tkΔ	-	-	-	(+)	(+)	-	4		32
	19 tkΔ	-	-	(+)	(+)	(+)	-	4		8

^a Negative sample.

^b Positive sample. Viral titers expressed as log₁₀ TCID₅₀/mL.

^c Positive sample after second or third passage in cell culture (titer <10^{0.9}TCID₅₀/mL).

^d Samples negative by virus isolation – positive by nested-PCR.

Table 4. Detection of glycoprotein B mRNA of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) by reverse transcriptase-PCR (rt-PCR) in neural and non-neural tissues of lambs inoculated with the parental BoHV-5 (SV-507/99) or with the recombinant BoHV-5*tk*Δ.

Group	Animal#	Trigeminal Ganglia	Pharyngeal Tonsil	Palatine Tonsil	Retropharyngeal Lymph Node
SV-507/99	7 wt 3pDx	+ ^a	+	- ^b	+
	9 wt 3pDx	+	-	+	-
	11 wt 3pDx	-	+	+	-
	3 wt 7pDx	-	+	+	-
	10 wt 7pDx	+	+	-	+
	12 wt 7pDx	-	-	-	-
BoHV-5 <i>tk</i> Δ	2 <i>tk</i> Δ 3pDx	-	+	-	-
	6 <i>tk</i> Δ 3pDx	-	+	+	-
	16 <i>tk</i> Δ 3pDx	-	-	-	-
	1 <i>tk</i> Δ 7pDx	-	-	-	-
	14 <i>tk</i> Δ 7pDx	-	-	-	-
	19 <i>tk</i> Δ 7pDx	-	-	-	-

^a Positive sample by rt-PCR.

^b Negative sample by rt-PCR.

5. CONCLUSÕES

- Ovinos se constituem em modelos adequados para o estudo da biologia da infecção aguda e latente pelo BoHV-5 e por recombinante do BoHV-5 defectivo na enzima timidina quinase;
- A dexametasona é mais eficiente para reativação da latência quando comparada ao uso de flumetasona em ovinos;
- A enzima TK do BoHV-5 não é necessária para a replicação viral durante a infecção aguda ou para o estabelecimento de latência;
- A presença da enzima TK é correlacionada com aumento da colonização nos gânglios trigêmeos (TG) com DNA latente do BoHV-5 e com reativação eficiente da infecção latente;
- Tanto o BoHV-5 quanto o recombinante BoHV-5 $tk\Delta$ são capazes de estabelecer e reativar a infecção latente em tecidos linfoides;
- O BoHV-5 $tk\Delta$ parece não reativar a infecção latente em tecidos neurais.

6. REFERÊNCIAS

- ABRIL, C. et al. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v.78, n.7, p.3644-3653, 2004.
- ACKERMANN, M. et al. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p. 36-40, 1982.
- ANZILIERO D. et al. Immunization of calves with a recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E confers protection against BoHV-5 and BoHV-1 challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n,1, p.23-30, 2011.
- BAGUST, T.J. & CLARK, L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, p. 375-383, 1972.
- BARTHA, A. et al. Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.19: 145-151, 1969.
- BELKNAP, E.B. et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v.31, p.358-365, 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**, v. 17, p. 2297-2305, 1999.
- BELTRÃO, N. et al. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.4, p.144-150, 2000.
- BRUM, M.C.S. et al. Selection and characterization of brivudina resistant bovine herpesvírus type 5. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.124-132, 2010.
- CADORE, G.C. et al. Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1090-1096, 2011.
- CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v.84, n.4, p.285-295, 2002.
- CARRILLO, B.J. et al. Pathology of bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B Journal**, v.30, p.161- 168, 1983a.

CARRILLO, B.J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B Journal**, v.30, p.327-332, 1983b.

CASCIO, K.E. et al. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.134-139, 1999.

CAUDALL, J.W. et al. Recovery of a latent HSV-1 thymidine kinase negative strain following iontophoresis and co-cultivated in the ocularly-infected rabbit model. **Current Eyes Research**, v.5, p.41-45, 1986.

CHEN, S.H. et al. Competition and complementation between thymidine kinase-negative and wild-type herpes simplex virus during co-infection of mouse trigeminal ganglia. **Journal of General Virology**, v.87, p.3495-3502, 2006.

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

CHOWDHURY, S.I. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). Meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **Journal Comparative Pathology**, v.117, p.295-310, 1997.

COEN, D.M. et al. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.86, p.4736-4740, 1989.

D'OFFAY, J.M. et al. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal Veterinary Research**, v.54, p.439-534, 1993.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.327-334, 2006.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P. et al. Biology of herpesvirus 5. **Veterinary Journal**, v.184, p.138-145, 2009.

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

DIEL, D.G. et al. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.164-170, 2005.

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

DRAGO, L. et al. Comparison of nested PCR and real time PCR of herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. **BMC Infectious Disease**, v.4, p.1-5, 2004.

EFSTATHIOU, S. et al. The role of herpes simplex virus type thymidine kinase in pathogenesis. **Journal General of Virology**, v.70, p.869-879, 1989.

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

FERRARI, M. et al. The response of pigs inoculated with a thymidine kinase-negative (TK-) pseudorabies virus to challenge infection with virulent virus. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v.23, p.15-26, 2000.

FIELD H.J. & WILDY P. The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus in mice. **Journal of Hygiene**, v.81, p.267, 1978.

FLORES, E.F. & DONIS, R.O. Isolation and characterization of a bovine cell line resistant to infection with the pestivirus bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Virology**, v.208 p.565-575, 1995.

FRANCO, A.C. et al. Construction and characterization of a bovine herpesvirus 5 mutant with a deletion of the gI, gE and US9 genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.667-673, 2007.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.216-221, 1962.

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**, v.94, p.109-122, 1987.

JACOBS, L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other *Alphaherpesvirinae*. **Archives of Virology**, v.137, p.209-228, 1994.

JACOBSON, J.G. et al. Herpes simplex virus thymidine kinase and specific stages of latency in murine trigeminal ganglia. **Journal of Virology**, v.67, p.6903-6908, 1993.

JACOBSON, J.G. et al. Synergistic effects on ganglionic herpes simplex virus infections by mutations or drugs that inhibit the viral polymerase and thymidine kinase. **Virology**, v.206, p.263-268, 1995.

JAMIESON, A.T. et al. Induction of both thymidine and deoxycytidine kinase activity by herpes viruses. **Journal General of Virology**, v.24, p.465-480, 1974.

JOHNSTON, L.A.Y. et al. A viral meningo-encephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.207-215, 1962.

- KAASHOEK, M.J. et al. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E- negative bovine herpesvirus 1 mutants. **Veterinary Microbiology**, v.48, p.143-153, 1996.
- KIRKLAND, P. D. et al. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Record**, v.165, n.4, p.111-113, 2009.
- KIT, S. Thymidine kinase. **Microbiological Science**, v.2, n.12, p.369-375, 1985.
- KLEIN, R.J. et al. Experimental skin infection with an acyclovir resistant herpes simplex virus mutant: response to antiviral treatment and protection against reinfection. **Archives of Virology**, v.65, p.237-246, 1980.
- KRAMER, M.F. et al. Accumulation of viral transcripts and DNA during establishment of latency by herpes simplex virus. **Journal of Virology**, v.72, p.1177-1185, 1998.
- LEE, B.J. et al. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal Neurovirology**, v.5, p.474-484, 1999.
- LOVATO, L.T. et al. Herpesvírus bovino tipo1 (BHV1): inquérito soropidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.425-430, 1995.
- MENGELING, W.L. Virus reactivation in pigs latently infected with a thymidine kinase negative vaccine strain of pseudorabies virus. **Archives of Virology**, v.120, p.57-70, 1991.
- MENGELING, W.L. et al. Effect of various vaccination procedures on shedding, latency, and reactivation of attenuated and virulent pseudorabies virus in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p.2164-2173, 1992.
- METTENLEITER, T.C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, v.92, p.197-206, 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**, v.87, p.205-217, 1986.
- MEYER, G., et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, p.633-652, 2001.
- MORETTI, B. et al. Infectious bovine rhinotracheitis clinical observations and isolation of virus. **Veterinaria Italiana**, v.15, p.676, 1964.
- MOORMANN, et al., Inactivation of thymidine kinase gene of a gI deletion mutante of pseudorabies vírus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. **Journal of General Virology**, v.71, n.7, p. 1591-1595, 1990.

NARITA, M. et al. Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Journal Comparative Pathology**, v.86, p.93-100, 1976.

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

OLDONI, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.2, p.213-221, 2004.

PASTORET, P.P. et al. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. **Veterinary Microbiology**, v.4, p.149-159, 1979.

RANDALL, L. & ROIZMAN, B. The molecular basis of herpes simplex virus pathogenicity. **Seminars in Virology**, v.5, p.261-271, 1994.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, n.3, p.493-497, 1938.

RIET-CORREA, F. et al. Meningoencefalite e necrose no córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvirus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9 p.13-16, 1989.

RISSI D.R. et al. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.251-260, 2007.

ROCHA, M.A. et al. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina do sêmen congelado para comercialização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, p.737-739, 1994.

ROCK, D.L. et al. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v.66, p.2484-2490, 1992.

ROCK, D.L. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. **Seminars in Virology**, v.4, p.157-165, 1993.

ROCK, D. Latent infection with bovine herpesvirus type-1. **Seminars in Virology**, v.5, p.233-240, 1994.

ROELS, S. et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, v.146, p.586-588, 2000.

ROIZMAN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses. **Archives of Virology**, v.123, p.425-449, 1992.

ROIZMAN, B. & KNIPE, D.M. Herpes simplex viruses and their replication, In: *Fields Virology*, 4ed. p.2399-2459, 2001.

SALVADOR S.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.2, p.76-83, 1998.

SANTOS, C.M.B. et al. Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E (gE), thymidine kinase (TK) and both, gE/TK. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.4, p.319-325, 2011.

SCHUDEL, A.A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medical**, v.33, p.303-310, 1986.

SCHWYZER, M. & ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.17-29, 1996.

SEARS, A.E. et al. Establishment of latency in mice by herpes simplex virus 1 recombinants that carry insertions affecting regulation of the thymidine kinase gene. **Journal of Virology**, v.55, p.410-416, 1985.

SHERLEY, J.L., KELLY, T.J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. **Journal of Biological Chemistry**. v.263 n.17, p.8350-8358, 1988.

SILVA, A.M. et al. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Veterinary Microbiology**, v.66, p.89-99, 1999a.

SILVA, A.M. et al. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista de Microbiologia**, v.30, p.22-31, 1999b.

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**, v.129, p.191-199, 2007.

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

STEINER, I. & KENNEDY, G. E. Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. **Journal for Neurovirology**, v.1, p.19-29, 1995.

STEWART, C.J. et al. Evidence for transcriptional and post-transcriptional control of the cellular thymidine kinase gene". **Molecular and Cellular Biology**, v.7, n.3, p.1156-1163, 1987.

TENSER, R.B. & DUNSTAN, M.E. Herpes simplex virus thymidine kinase expression. In infection of the trigeminal ganglio. **Virology**, v.99, p.417-422, 1979.

TENSER, R.B. et al. Thymidine plaque autoradiography of thymidine kinase-positive and thymidine kinase-negative herpesviruses. **Journal Clinical Microbiology**, v.17, p.122-127, 1983.

TENSER, R.B. et al. Latency-associated transcript but not reactivatable virus is present in sensory ganglion neurons after inoculation of thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v.63, p.2861-2865, 1989.

TENSER, R.B. et al. Reactivation of thymidine kinase-defective herpes simplex virus is enhanced by nucleoside. **Journal of Virology**, v.70, p.1271-1276, 1996.

THIRY, E. et al. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.10, p.59-63, 1987.

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

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. The use of markers vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, v.44, p.75-81, 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine viral vaccines, diagnostics, and eradication: Past, present, and future. **Advanced Veterinary Medicine**, v.41, p.197-216, 1999.

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

VOGEL, F.S.F. et al., Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.185-196, 2004.

WAGNER, E.K. & BLOOM, D.C. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.419-434, 1997.

WATKINS, A.M. et al. Inhibition of virus-encoded thymidine kinase suppresses herpes simplex virus replication in vitro and in vivo. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v.9, p.9-18, 1998.

WEIBLEN R. et al. Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v.124, p.666-667, 1989.

WEIBLEN, R. et al. Bovine herpesvirus isolates. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.208-211, 1996.