

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

**REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL E
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA
MAMILITE PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 2
(BoHV-2) EM OVINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sabrina Ribeiro de Almeida

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL E CARACTERIZAÇÃO
CLÍNICO-PATOLÓGICA DA MAMILITE PELO
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 2 (BoHV-2) EM OVINOS.**

Por

Sabrina Ribeiro de Almeida

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

Orientador: Prof. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS, Brasil
2006

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

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

**Reprodução experimental e caracterização clínico-patológica da mamilite
pelo herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) em ovinos.**

Elaborada por
Sabrina Ribeiro de Almeida

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Rudi Weiblen, PhD, UFSM
(Presidente/Orientador)**

Luiz Carlos Kreutz, PhD, UPF

Luizinho Caron, Dr, IRFA

Santa Maria, 21 de dezembro de 2006.

Almeida, Sabrina Ribeiro de, 1980-

A447r

Reprodução experimental e caracterização clínico-patológica da mamilite pelo herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) em ovinos / por Sabrina Ribeiro de Almeida ; orientador Rudi Weiblein. - Santa Maria, 2006.

47 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2006.

1. Medicina veterinária 2. Herpesvírus bovino tipo 2 3. BoHV-2 4. Mamilite herpética 5. Ovinos 6. Modelo experimental I. Weiblein, Rudi, orient. II. Título

CDU: 619:636.32/.38

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

Quero, um dia, poder dizer às pessoas
que nada foi em vão... e que eu sempre
dei o melhor de mim... e que valeu a
pena!!!

(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Oswaldo Silva de Almeida e Rosemeire Ribeiro de Almeida, por sonharem comigo e acreditarem sempre que eu “sou capaz”; pelo amor e apoio incondicionais.

Ao professor Rudi Weiblen, pelo exemplo de competência e profissionalismo; pelos “puxões” de orelha e amizade sincera.

À família Weiblen, pela acolhida carinhosa e pelos momentos “família”, que muitas vezes diminuíram a distância da terrinha.

Ao professor Eduardo Furtado Flores, pela orientação, paciência, confiança, carinho e amizade.

À professora Luciane Lovato, aos funcionários Neíte Machado e Jorge Martins, e aos colegas Diego Diel, Letícia Frizzo, Mário Brum, Sandra Arenhart, Renata Dezengrini, Helton Fernandes, Andréia Henzel e Mariana Sá, pela paciência no convívio diário, pelos momentos de descontração e auxílio nos experimentos.

Aos bolsistas de iniciação pelo auxílio na manipulação dos animais e colaboração em todas as atividades do Setor de Virologia.

A toda família SV, pela acolhida carinhosa... muito obrigada!

Aos professores Cláudio L. Barros e Severo S. Barros, e ao colega Daniel Rissi pelas avaliações histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, e ajuda na interpretação dos resultados.

À equipe do Biotério Central da UFSM pelo alojamento e auxílio na manipulação dos animais.

Às amigas Lê, Fê e Dati, pela amizade sincera, convivência saudável e principalmente pela paciência na reta final.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de completar mais uma etapa em minha formação acadêmica.

RESUMO

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

REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA MAMILITE PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 2 (BoHV-2) EM OVINOS.

AUTOR: SABRINA RIBEIRO DE ALMEIDA
ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN
Santa Maria, 21 de dezembro de 2006.

A mamilite causada pelo herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) é uma importante enfermidade de gado leiteiro, porém pouco se sabe sobre a sua patogenia. O presente trabalho teve como objetivos reproduzir e caracterizar em ovinos as manifestações clínico-patológicas associadas com a infecção natural de bovinos pelo BoHV-2. Em um primeiro experimento, dez cordeiros foram inoculados na mucosa nasal e a infecção aguda foi monitorada nos aspectos clínicos, virológicos e sorológicos. Excreção viral em secreções nasais foi detectada em 7/10 animais entre os dias 2 e 8 pós-inoculação (pi), com duração que variou entre um e três dias. Todos os animais apresentaram secreção nasal serosa, passando a mucosa e mucopurulenta, entre os dias 2 e 5 pi, e sete deles apresentaram também hiperemia e o desenvolvimento de vesículas, pústulas e erosões na mucosa nasal entre os dias 4 e 8 pi. Todos os animais soroconverteram ao BoHV-2. A administração de dexametasona aos 40 dias pi não foi seguida de excreção viral, soroconversão ou recrudescência clínica. Em um segundo experimento, oito ovelhas lactantes foram inoculadas na pele das tetas e do úbere, seguida da caracterização virológica, clínica e histopatológica da infecção aguda. O vírus foi isolado a partir de suabes coletados das lesões de uma ovelha nos dias 7 e 8 pi. Cinco (5/8) animais desenvolveram lesões nos locais de inoculação entre os dias 4 e 6 pi. As lesões apresentaram características clínico-patológicas semelhantes às observadas em infecções naturais, e se caracterizaram por hiperemia, edema, pápula, vesículas, exsudação e formação de crostas. Histologicamente, as lesões se caracterizaram por edema intracelular, presença de um infiltrado linfoplasmocitário multifocal e predominantemente perivascular na derme, além de corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranucleares em células inflamatórias e células sinciciais. Partículas víricas com morfologia típica de herpesvírus foram observadas sob microscopia eletrônica de transmissão. Esses resultados indicam que ovinos são susceptíveis à infecção pelo BoHV-2 e

desenvolvem lesões características de mamilite herpética quando inoculados experimentalmente, podendo ser utilizados para estudos de patogenia, desenvolvimento de vacinas e pesquisas de drogas antivirais

Palavras-chave: Herpesvírus bovino tipo 2, BoHV-2, mamilite herpética, ovinos, modelo experimental.

ABSTRACT

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

EXPERIMENTAL REPRODUCTION AND CLINICO-PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MAMMILLITIS BY BOVINE HERPESVIRUS TYPE 2 (BoHV-2) IN SHEEP.

AUTHOR: SABRINA RIBEIRO DE ALMEIDA
ADVISER: RUDI WEIBLEN
Santa Maria, December, 21th, 2006.

The bovine mammillitis caused by bovine herpesvirus type 2 (BoHV-2) is an important disease of dairy cattle yet very little is known about its pathogenesis. This study aimed at reproducing and characterizing the clinical-pathological aspects of bovine herpesvirus mammillitis in experimentally infected sheep. In the first experiment, ten lambs were inoculated in the nasal mucosa and the virological, clinical and serological aspects of acute infection were monitored. Virus shedding was detected in nasal secretions of 7 lambs between days 2 and 8 post inoculation (pi) and lasted from one to three days. A serous nasal discharge, changing to mucous and mucopurulent, was observed in all animals between days 2 and 5 pi. Seven lambs developed vesicles, pustules and erosions in the nasal mucosa between days 4 and 8 pi. All inoculated animals seroconverted to BoHV-2. Dexamethasone administration at day 40 pi was not followed by virus shedding, clinical recrudescence or seroconversion. In the second experiment, eight milking ewes were inoculated in the skin of the teats and udder, and monitored thereafter regarding to viral replication, clinical signs and histological changes. Infectious virus was isolated from lesion swabs of one ewe on days 7 and 8 pi. Five animals developed lesions in inoculation sites between days 4 and 6 pi. The clinical-pathological aspects of the lesions were similar to those of natural infections and were characterized by erythema, edema, papules, vesicles, exudation and scabs. By histological examination, the lesions displayed cellular edema and lymphoplasmocytic multifocal infiltrate surrounding blood vessels in the dermis. Moreover, eosinophilic intranuclear inclusion bodies were observed in inflammatory cells and syncytia. Virus particles resembling herpesvirus were observed by electronic transmission microscopy. These results indicate that sheep are susceptible to BoHV-2 infection, and can develop clinical signs similar to those observed in

cattle in natural outbreaks of herpes mammillitis. Thus, this animal species may be used as a model to study pathogenesis, vaccine development and antiviral drugs.

Key words: Bovine herpesvirus type 2, BoHV-2, bovine herpes mammillitis, sheep, experimental model.

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – Sinais clínicos observados em cordeiros inoculados com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) na mucosa nasal. **(A)** Cordeiro 135 (dia 8 pi): secreção mucopurulenta; **(B)** Cordeiro 132 (dia 7 pi): hiperemia, vesícula (seta) e erosão (cabeça de seta)..... 39
- FIGURA 2 - Sinais clínicos observados nas tetas de ovelhas lactantes inoculadas com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). **(A)** Ovelha 126 (dia 6 pi): hiperemia, pápula e vesícula (seta); **(B)** Ovelha 108 (dia 7 pi): hiperemia, edema e início da formação de crostas, e **(C)** hiperemia, edema e crostas (dia 12 pi)..... 40
- FIGURA 3 – Corte histológico da pele do úbere da ovelha 126 inoculada com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). **(A)** Área focal e extensa de necrose epidérmica e infiltrado de células inflamatórias, com formação de uma fenda na junção dermoepidérmica. São também observadas numerosas inclusões eosinofílicas intranucleares em células epiteliais (cabeça de setas). **(B)** Duas células sinciciais estão presentes na epiderme (setas) e há infiltrado inflamatório misto na derme superficial. HE, obj.40..... 41
- FIGURA 4 – Corte histológico de pele da teta da ovelha 126 inoculada com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico na derme profunda e ao redor de estruturas anexas (glândulas sebáceas). HE, obj.20..... 42
- FIGURA 5 – Fotomicrografia de lesão crostosa na ovelha 126 inoculada com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Em meio a detritos celulares observam-se vários vírions com morfologia compatível com herpesvírus (setas). Barra=100 nm..... 43

LISTA DE TABELAS

2. CAPÍTULO 1

- TABELA 1 - Excreção viral, curso clínico e resposta sorológica durante a infecção aguda e após a administração de dexametasona em cordeiros inoculados na mucosa nasal com o herpesvírus bovino tipo 2..... 37
- TABELA 2 - Excreção viral, curso clínico e resposta sorológica durante a infecção aguda em ovelhas lactantes inoculadas na pele das tetas e do úbere com o herpesvírus bovino tipo 2..... 38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. CAPÍTULO 1. REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA MAMILITE PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 2 (BoHV-2) EM OVINOS	16
Abstract.....	17
Resumo.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	24
Discussão.....	27
Referências.....	33
3. CONCLUSÕES.....	44
4. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) é um vírus DNA de cadeia dupla e linear, possui um capsídeo de simetria icosaédrica e um envelope lipoprotéico (ROIZMAN, 1992). Esse vírus replica em uma grande variedade de cultivos celulares, embora cultivos de células primárias de origem bovina sejam particularmente susceptíveis, dentre elas aquelas originadas de rim e testículos bovinos. O efeito citopático do BoHV-2 é caracterizado pela formação de sincícios e inclusões intranucleares eosinofílicas em células infectadas (RWEYEMAMU & GIBBS, 1977). Temperaturas próximas a 33° favorecem a replicação viral em cultivos celulares (O'CONNOR, 1985).

O BoHV-2 está classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*. Outros herpesvírus de importância veterinária também estão classificados nessa família, como os herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5, o herpesvírus equino tipo 1 e o vírus da pseudorraiva suína, no entanto, não existe reações de neutralização cruzada entre eles e o BoHV-2 (MARTIN & HAY, 1966 & ALICE, 1977). No gênero *Simplexvirus*, além do BoHV-2 também estão classificados os vírus do herpes simplex humano tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), com os quais o BoHV-2 possui grande relação antigênica (ROIZMAN, 1992). Soro humano contendo anticorpos contra HSV-1 ou HSV-2 neutraliza o BoHV-2 e, da mesma forma, antissoro contra o BoHV-2 neutraliza o HSV-1 e o HSV-2 (STERZ et al., 1973). Tendo como base a similaridade genética e a relação antigênica, o BoHV-2 vem sendo utilizado como modelo para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra as infecções pelo HSV-1 e HSV-2. Bovinos inoculados com o HSV-1 ou HSV-2 inativados não apresentam quaisquer sinais clínicos e tornam-se parcialmente resistentes à infecção pelo BoHV-2 (CASTRUCCI et al., 1981; CASTRUCCI et al., 1984). A inoculação de cobaias com o BoHV-2, da mesma forma, confere proteção contra a infecção genital pelo HSV-2 (SMEE & LEONHARDT, 1994).

O BoHV-2 é o agente etiológico da mamilite herpética, uma doença que possui distribuição mundial e apresenta importante repercussão sanitária, principalmente em gado leiteiro (RWEYEMAMU & GIBBS, 1977).

A mamilite herpética é uma enfermidade caracterizada pela formação de lesões vesiculares nas tetas e ocasionalmente no úbere de vacas (MARTIN & GWYNNE, 1968; CASTRUCCI et al., 1972). Inicialmente relatada em Ruanda-Urandi, na África (HUYGELEN et al., 1960), a doença foi subsequentemente diagnosticada em vários outros países (MARTIN

& GWYNNE, 1968; YEDLOUTSCHNIG et al., 1970; CASTRUCCI et al., 1972; TURNER et al., 1974; ALICE, 1977; GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; CASTRO et al., 1988; IMAI et al., 2001).

No Brasil, existem poucas informações sobre a ocorrência da infecção. O BoHV-2 foi isolado em duas ocasiões no país, nas décadas de 70 e 80 (ALICE, 1977; CASTRO et al., 1988) e a partir desses relatos pouco se soube sobre a presença do vírus no rebanho brasileiro. No entanto, casos de mamilite com características clínicas compatíveis com a infecção pelo BoHV-2 têm sido freqüentemente relatados por veterinários de campo (KREUTZ, L.C., 2006. Informe verbal). Um estudo sorológico realizado em duas bacias leiteiras do país revelou que o BoHV-2 está presente e amplamente disseminado nos rebanhos bovinos estudados (ALMEIDA, S.R., 2006). É possível que a mamilite herpética tenha passado despercebida ou confundida com outras enfermidades como infecções pelo vírus *Vaccinia* e pelo vírus da pseudovariola (JACKSON, 1993; LOBATO et al., 2005). A pseudovariola é freqüente no Brasil, principalmente na região sudeste. No entanto, essa enfermidade apresenta um curso mais prolongado e acomete também humanos. Por outro lado, infecções pelos vírus da variola bovina e *Vaccinia* são freqüentemente acompanhadas de sinais clínicos mais severos (LOBATO et al., 2005).

As lesões nas tetas dificultam a ordenha e conseqüentemente predispõem à mastite. As maiores perdas estão relacionadas com a redução da produção leiteira devido a ocorrência de mastites intercorrentes, custo do tratamento e descarte do leite (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977). Embora a infecção de humanos pelo BoHV-2 não tenha sido confirmada, existem relatos de lesões em humanos que tiveram contato com bovinos infectados (MARTIN et al., 1966; PEPPER et al., 1966). No momento não existem vacinas comerciais disponíveis para a proteção de bovinos contra a infecção pelo BoHV-2 (RWEYEMAMU & GIBBS, 1977).

As vias de transmissão e a patogenia da infecção pelo BoHV-2 são assuntos que geram muitas controvérsias. A patogenia da infecção pelo BoHV-2 é pouco conhecida. Isso deve-se, em parte, à dificuldade de reprodução experimental da doença, principalmente devido à incerteza quanto a via natural de infecção. A inoculação endovenosa de bovinos reproduz lesões disseminadas na pele, principalmente na face e dorso (HAIG, 1967; CASTRUCCI et al., 1978), enquanto a inoculação intradérmica reproduz lesões localizadas restritas ao local de inoculação (CASTRUCCI et al., 1979; MARTIN & SCOTT, 1979).

Embora existam indícios de transmissão através de insetos vetores (PEPPER et al., 1966; MARTIN et al., 1966), tentativas de reproduzir a mamilite herpética utilizando moscas hematófagas como vetores não foi possível experimentalmente (GIBBS et al., 1973).

A falta de um modelo animal também tem sido um fator limitante para os estudos da patogenia das infecções pelo BoHV-2. A mamilite herpética só foi reproduzida experimentalmente após a inoculação intradérmica (MARTIN et al., 1969; CASTRUCCI et al., 1979) ou após escarificações profundas nas tetas e úbere de vacas (GIBBS et al., 1973). Ovinos podem desenvolver lesões semelhantes às observadas em bovinos quando inoculados pela via endovenosa ou intradérmica; no entanto, caprinos não desenvolvem lesões características (WESTBURY, 1981).

Este trabalho teve como objetivo reproduzir, em ovinos, as manifestações clínico-patológicas associadas com a infecção natural de bovinos pelo BoHV-2, a fim de estabelecer um modelo animal adequado para estudos de patogenia e para um eventual desenvolvimento e testes de vacinas e de drogas antivirais.

2. CAPÍTULO 1

Reprodução experimental e caracterização clínico-patológica da mamilitite pelo herpesvírus bovino tipo 2 em ovinos.

Experimental reproduction and clinico-pathological characterization of mamillitis by bovine
herpesvirus type 2 in sheep.

**Sabrina Ribeiro de Almeida¹, Diego Gustavo Diel¹, Rudi Weiblen², Eduardo Furtado
Flores^{2*}**

(Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, dezembro de 2006).

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Depto de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

Fone/fax: 55-3220-8034. *Autor para correspondência: E-mail: flores@ccr.ufsm.br.

ABSTRACT.- Almeida S.R., Diel D.G., Weiblen R., Flores E.F. 2006. [**Experimental reproduction and clinico-pathological characterization of mammillitis by bovine herpesvirus type 2 in sheep.**] Reprodução experimental e caracterização clinico-patológica da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 2 em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* (). Depto Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: flores@ccr.ufsm.br. The bovine mammillitis caused by bovine herpesvirus type 2 (BoHV-2) is an important disease of dairy cattle yet very little is known about its pathogenesis. This study aimed at reproducing and characterizing the clinical-pathological aspects of bovine herpesvirus mammillitis in experimentally infected sheep. In the first experiment, ten lambs were inoculated in the nasal mucosa and the virological, clinical and serological aspects of acute infection were monitored. Virus shedding was detected in nasal secretions of 7 lambs between days 2 and 8 post inoculation (pi) and lasted from one to three days. A serous nasal discharge, changing to mucous and mucopurulent, was observed in all animals between days 2 and 5 pi. Seven lambs developed vesicles, pustules and erosions in the nasal mucosa between days 4 and 8 pi. All inoculated animals seroconverted to BoHV-2. Dexamethasone administration at day 40 pi was not followed by virus shedding, clinical recrudescence or seroconversion. In the second experiment, eight milking ewes were inoculated in the skin of the teats and udder, and monitored thereafter regarding to viral replication, clinical signs and histological changes. Infectious virus was isolated from lesion swabs of one ewe on days 7 and 8 pi. Five animals developed lesions in inoculation sites between days 4 and 6 pi. The clinical-pathological aspects of the lesions were similar to those of natural infections and were characterized by erythema, edema, papules, vesicles, exudation and scabs. By histological examination, the lesions displayed cellular edema and lymphoplasmocytic multifocal infiltrate surrounding blood vessels in the dermis. Moreover, eosinophilic intranuclear inclusion bodies were observed in inflammatory cells and syncytia. Virus particles resembling herpesvirus were observed by electronic transmission microscopy. These results indicate that sheep, mainly milking ewes, are susceptible to BoHV-2 infection and can develop clinical signs similar to those observed in cattle in natural outbreaks of herpes mammillitis. Thus, this animal species may be used as a model to study pathogenesis, vaccine development and also antiviral drugs.

INDEX TERMS: Bovine herpesvirus type 2, BoHV-2, bovine herpes mammillitis, sheep, experimental model.

RESUMO.- A mamilite causada pelo herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) é uma importante enfermidade de gado leiteiro, porém pouco se sabe sobre a sua patogenia. O presente trabalho teve como objetivos reproduzir e caracterizar em ovinos as manifestações clínico-patológicas associadas com a infecção natural de bovinos pelo BoHV-2. Em um primeiro experimento, dez cordeiros foram inoculados na mucosa nasal e a infecção aguda foi monitorada nos aspectos clínicos, virológicos e sorológicos. Excreção viral em secreções nasais foi detectada em 7/10 animais entre os dias 2 e 8 pós-inoculação (pi), com duração que variou entre um e três dias. Todos animais apresentaram secreção nasal serosa, passando a mucosa e mucopurulenta, entre os dias 2 e 5 pi, e sete deles apresentaram também hiperemia e o desenvolvimento de vesículas, pústulas e erosões na mucosa nasal entre os dias 4 e 8 pi. Todos os animais soroconverteram ao BoHV-2. A administração de dexametasona aos 40 dias pi não foi seguida de excreção viral, soroconversão ou recrudescência clínica. Em um segundo experimento, oito ovelhas lactantes foram inoculadas na pele das tetas e do úbere, seguida da caracterização virológica, clínica e histopatológica da infecção aguda. O vírus foi isolado a partir de suabes coletados das lesões de uma ovelha nos dias 7 e 8 pi. Cinco (5/8) animais desenvolveram lesões nos locais de inoculação entre os dias 4 e 6 pi. As lesões apresentaram características clínico-patológicas semelhantes às observadas em infecções naturais, e se caracterizaram por hiperemia, edema, pápula, vesículas, exsudação e formação de crostas. Histologicamente, as lesões se caracterizaram por edema intracelular, presença de um infiltrado linfoplasmocitário multifocal e predominantemente perivascular na derme, além de corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranucleares em células inflamatórias e células sinciciais. Partículas víricas com morfologia típica de herpesvírus foram observadas sob microscopia eletrônica de transmissão. Esses resultados indicam que ovinos, particularmente ovelhas lactantes, são susceptíveis à infecção pelo BoHV-2 e desenvolvem lesões características de mamilite herpética quando inoculados experimentalmente, podendo ser utilizados para estudos de patogenia, desenvolvimento de vacinas e pesquisas de drogas antivirais

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvírus bovino tipo 2, BoHV-2, mamilite herpética, ovinos, modelo experimental.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 2 (BoHV-2), agente etiológico da mamilite herpética, é um vírus DNA, envelopado, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*. Nesse gênero também estão classificados os vírus do herpes simplex humano tipos 1 e 2 (HSV-1; HSV-2), com os quais o BoHV-2 é antígenicamente relacionado (Roizman 1992).

Os alfa herpesvírus possuem um amplo espectro de hospedeiros, apresentam ciclo replicativo curto e se disseminam rapidamente em células de cultivo, resultando em destruição celular. Esses vírus estabelecem infecções latentes em neurônios de gânglios sensoriais e autonômicos após a infecção aguda (Roizman 1992). A capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes se constitui no ponto-chave na epidemiologia dos alfa herpesvírus (Jones 1998).

A infecção pelo BoHV-2 tem sido associada com duas formas clínicas distintas e bem definidas: lesões vesiculares nas tetas ou ocasionalmente disseminadas pelo úbere (mamilite herpética); e lesões generalizadas na pele (*pseudolumphy skin disease*) (Osorio 1992). Essas lesões podem ser confundidas com outras enfermidades de pele de bovinos, incluindo aquelas causadas pelo vírus *pseudocowpox* e pelo vírus *Vaccinia* (Jackson 1993, Lobato et al. 2005).

O BoHV-2 foi isolado pela primeira vez em 1957, na África do Sul, de bovinos com lesões generalizadas na pele (Alexander et al. 1957), e a seguir em Ruanda Urandi, de lesões em tetas de vacas leiteiras (Huygelen et al. 1960). Subseqüentemente, a infecção foi detectada em vários países, incluindo o Kênia (Martin & Gwynne 1968), Austrália (Turner et al. 1974), Reino Unido (Gibbs & Rweyemamu 1977), EUA (Yedloutschnig et al. 1970), Itália (Castrucci et al. 1972), Brasil (Alice 1977, Castro et al. 1988) e Japão (Imai et al. 2005).

Estudos sorológicos indicam que o BoHV-2 está presente no rebanho bovino de vários países em níveis variados de prevalência (Dardiri & Stone 1972, Martin & Gwynne 1968, Scott & Martin 1978, Imai et al. 2005). Anticorpos contra o BoHV-2 também foram detectados em bubalinos e em várias espécies de animais silvestres no leste da África, mesmo na ausência de sinais clínicos da infecção, sugerindo que as infecções são frequentemente subclínicas (Martin & Gwynne 1968).

Apesar da infecção também ter sido diagnosticada em bovinos de corte, os maiores prejuízos ocasionados pela infecção com o BoHV-2 ocorrem em gado leiteiro (Johnston 1971). As maiores perdas estão relacionados com a redução da produção leiteira devido à mastites intercorrentes, custo do tratamento e descarte do leite (Gibbs & Rweyemamu 1977). Relatos de surtos de mamilite herpética indicam que a doença se manifesta de forma mais severa em novilhas lactantes de primeira cria (Deas & Johnston 1966, Rweyemamu et al. 1966).

A mamilite herpética é uma enfermidade primariamente da glândula mamária, embora possa se manifestar como uma doença localizada ou generalizada, dependendo da via de infecção (Dardiri 1973). A patogenia da infecção pelo BoHV-2 é pouco conhecida. Além da dificuldade de reprodução experimental da doença, existem dúvidas quanto à via natural de infecção. A inoculação endovenosa de bovinos reproduz lesões disseminadas na pele, principalmente na face e dorso (Haig 1967, Castrucci et al. 1978), enquanto a inoculação intradérmica reproduz lesões localizadas restritas ao local de inoculação (Castrucci et al. 1979, Martin & Scott 1979).

A mamilite herpética somente foi reproduzida experimentalmente após a inoculação intradérmica (Martin et al. 1969, Castrucci et al. 1979) ou após escarificações profundas nas tetas e úbere de vacas (Gibbs et al. 1973). Ovinos podem desenvolver lesões semelhantes às observadas em bovinos quando inoculados pelas vias endovenosa ou intradérmica; no entanto,

caprinos não desenvolvem lesões características (Westbury 1981). A infecção também foi reproduzida experimentalmente em camundongos, coelhos e cobaias (Pepper et al. 1966, Castrucci et al. 1972, Castro et al. 1988).

A capacidade do BoHV-2 estabelecer infecções latentes em bovinos foi confirmada por Martin & Scott (1979). A biologia da infecção latente, no entanto, ainda não foi satisfatoriamente esclarecida e resultados inconsistentes de reativação experimental da infecção têm sido relatados (Westbury 1981, Castrucci et al. 1983).

O objetivo deste estudo foi reproduzir em ovinos as manifestações clínico-patológicas associadas à infecção natural de bovinos pelo BoHV-2. Para isto, cordeiros e ovelhas lactantes foram inoculados na mucosa nasal e na pele das tetas e do úbere, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

O presente estudo consistiu de duas inoculações experimentais de ovinos com o BoHV-2. No primeiro experimento, dez cordeiros foram inoculados na mucosa nasal e a infecção aguda foi monitorada nos aspectos virológicos, clínicos e sorológicos. Quarenta dias após a inoculação, os animais foram submetidos à administração de dexametasona (Dx) na tentativa de reativar a infecção latente. O segundo experimento consistiu da inoculação do BoHV-2 na pele das tetas e do úbere de oito ovelhas lactantes, seguida da caracterização virológica, clínica e histopatológica da infecção aguda.

Células e vírus

A amplificação, quantificação e isolamento de vírus de secreções e tecidos, e os testes de soroneutralização (SN) foram realizados em células da linhagem CRIB (Flores & Donis 1995). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina

(1,6mg/L), estreptomicina (0,4mg/L) e nistatina (0,02mg/L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A amostra do BoHV-2 utilizada nas inoculações e nos testes de SN foi cedida pelo Dr. Fernando Osorio (Department of Veterinary and Biomedical Science, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, NE, USA).

Experimento 1 - Infecção experimental de cordeiros

Dez cordeiros com aproximadamente 3 a 4 meses de idade, de ambos os sexos, soronegativos para o BoHV-2 foram inoculados com o vírus; um cordeiro permaneceu como controle. Os animais foram inoculados na mucosa nasal, com 2mL de uma suspensão contendo $10^{5,1}$ doses infectantes do vírus para 50% dos cultivos ($DICC_{50}$); o animal controle foi inoculado com MEM. A suspensão viral foi inoculada com o auxílio de suabes, depositando-se 1mL em cada narina e friccionando-se em seguida. Os animais foram monitorados clinicamente nos dias seguintes à inoculação, com aferição da temperatura retal e exame visual da mucosa nasal.

Secreções nasais para a pesquisa de vírus foram coletadas diariamente com o auxílio de suabes até o dia 12 pi. Os suabes foram acondicionados em 1mL de MEM e conservados a -70°C . Posteriormente, foram drenados, centrifugados a $1.165g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi inoculado em monocamadas de células CRIB cultivadas em placas de 24 cavidades. Os cultivos foram monitorados diariamente para o aparecimento de efeito citopático (ecp) durante três passagens de cinco dias cada.

Amostras de sangue para a sorologia foram coletadas no dia da inoculação (dia 0), e nos dias 14 e 28 pi. As amostras de soro foram submetidas aos testes de SN para a pesquisa de anticorpos contra o BoHV-2. Os testes de SN foram realizados em placas de poliestileno de 96 cavidades, com algumas modificações na metodologia utilizada por Dardiri & Stone (1972). Diluições crescentes do soro, partindo de 1:2, foram incubadas por 1 hora e 30 min a 37°C com 100-200 $DICC_{50}$ do BoHV-2 por cavidade. Após a incubação, uma suspensão de

células CRIB foi adicionada e as placas foram incubadas em estufa a 33°C com 5% de CO₂. A leitura dos testes foi realizada pelo monitoramento do ecp nos cultivos celulares após 72-96 h de incubação. O título neutralizante foi considerado a recíproca da maior diluição capaz de prevenir a produção de ecp.

Quarenta dias após a inoculação, os cordeiros foram submetidos à administração de Dx durante 5 dias consecutivos (0,25mg/kg/dia; Labovet Produtos Veterinários LTDA, Feira de Santana, BA, Brazil). Os animais foram monitorados clinicamente nos dias seguintes, com aferição da temperatura retal e exame da mucosa nasal. Secreções nasais para a pesquisa de vírus foram coletadas diariamente com o auxílio de suabes até o dia 12 após a administração de Dx (pDx). Amostras de sangue para a sorologia foram coletadas no dia da primeira administração de Dx (dia 40 pi) e nos dias 14 e 28 pDx. O processamento desse material foi realizado como descrito anteriormente.

Experimento 2 - Infecção experimental de ovelhas lactantes

Oito ovelhas lactantes, soronegativas para o BoHV-2, foram inoculadas na pele das tetas e do úbere com 2mL de uma suspensão viral contendo $10^{6.3}$ DICC₅₀/mL do BoHV-2. Previamente à inoculação, esses locais foram escarificados com uma esponja áspera. Após a escarificação, a suspensão viral foi distribuída homogeneamente no local, seguida da fricção leve com um suabe de algodão. Os cordeiros filhos das ovelhas inoculadas permaneceram com as mães durante todo o experimento.

Os animais foram monitorados diariamente após a inoculação, com aferição da temperatura retal e exame visual dos locais de inoculação. Suabes para a pesquisa de vírus foram coletados destes locais diariamente até o dia 14 pi. O processamento dos suabes e a pesquisa de vírus foram realizados como descrito anteriormente.

As lesões que se desenvolveram em dois animais foram submetidas à avaliação histológica e microscopia eletrônica de transmissão (ME). Do animal 166, foi coletado um

fragmento de aproximadamente 0,5 cm diâmetro de uma pápula na pele do úbere no dia 5 pi. Duas amostras de mesmas dimensões foram coletadas do animal 126: uma amostra foi coletada de uma pápula com vesícula observadas na pele de uma teta no dia 6 pi; e uma amostra de uma lesão crostosa na base de uma das tetas, no dia 8 pi. De cada fragmento, uma parte foi fixada em formaldeído tamponado por 12 a 24 horas, incluída em parafina, seccionada e corada com hematoxilina-eosina (HE) para exame histológico. Um parte do corte foi fixada em glutaraldeído 2,5%, pós-fixada em tetróxido de ósmio e processada para microscopia eletrônica de transmissão.

Amostras de sangue das ovelhas e dos respectivos cordeiros foram coletadas para a sorologia no dia da inoculação (dia 0), e nos dias 14 e 28 pi. Os testes de SN foram realizados como descrito anteriormente.

RESULTADOS

Experimento 1: Infecção experimental de cordeiros

A inoculação nasal do BoHV-2 nos cordeiros resultou em replicação viral na mucosa nasal e no desenvolvimento de lesões nos locais de inoculação. O vírus foi isolado de secreções nasais coletadas de sete animais, entre os dias 2 e 8 pi. A excreção viral em cada animal durou um a três dias (Tabela 1). Os animais inoculados apresentaram corrimento nasal entre os dias 2 e 5 pi. Esse corrimento foi inicialmente seroso, passando a mucoso e mucopurulento; de intensidade leve a moderada (Figura 1). Sete desses animais apresentaram hiperemia da mucosa nasal, entre os dias 4 e 8 pi, seguida de formação de vesículas, exsudação e erosões superficiais. As erosões evoluíram para pequenas úlceras com aproximadamente 0,3 cm de diâmetro, recobertas com material de aparência fibrinosa. As

lesões iniciaram a regressão a partir do dia 8 pi, resultando na completa resolução entre os dias 10 e 12 pi.

Os exames sorológicos realizados no dia 28 pi revelaram que todos os animais inoculados soroconverteram ao BoHV-2. O animal controle não apresentou quaisquer alterações clínicas e permaneceu soronegativo (Tabela 1).

O isolamento viral, associado com o desenvolvimento de lesões e de anticorpos neutralizantes, indica que o vírus replicou eficientemente na mucosa nasal dos cordeiros após a inoculação.

Na tentativa de reativar a infecção latente, os dez cordeiros inoculados foram submetidos à administração de Dx no dia 40 pi e monitorados quanto à excreção viral, sinais clínicos e sorologia nos dias seguintes. Os animais submetidos à administração de Dx não excretaram vírus nas secreções nasais, não desenvolveram lesões e não apresentaram aumento superior a quatro vezes no título de anticorpos no dia 28 pDx (Tabela 1).

Experimento 2: Infecção experimental de ovelhas lactantes

A inoculação do BoHV-2 na pele das tetas e do úbere das ovelhas lactantes resultou no desenvolvimento de lesões nos locais de inoculação. Somente foi possível isolar o vírus das lesões de uma ovelha nos dias 7 e 8 pi. As tentativas de isolar o vírus a partir de suabes coletados de outros animais foram infrutíferas.

Nos dias seguintes à inoculação, cinco ovelhas inoculadas desenvolveram lesões em uma teta, nas duas ou no úbere. As lesões foram inicialmente observadas entre os dias 4 e 6 pi, e se caracterizaram por hiperemia e edema de uma área circular de aproximadamente 0,5 a 1 cm de diâmetro nas tetas ou úbere (entre os dias 3 e 5 pi), seguida da formação de pápulas, vesículas, exsudação, erosão superficial e formação de crostas (Figura 2). Em algumas lesões, houve a formação de uma área central deprimida, circundada por um halo hiperêmico. A progressão das lesões foi marcada pelo aumento do diâmetro e hiperemia da região afetada.

Lesões de diferentes diâmetros desenvolveram-se na mesma teta ou em tetas diferentes. Em alguns animais, não foram observadas vesículas no local de inoculação; apenas lesões recobertas por crostas. A inoculação produziu lesões de severidade discreta a moderada que começaram a regredir a partir do dia 8 pi. As lesões se mantiveram recobertas por crostas até ao redor do dia 14 pi.

Dois cordeiros, filhos de ovelhas que apresentaram lesões nas tetas, desenvolveram lesões próximas à comissura labial. As lesões crostosas foram observadas inicialmente em torno do dia 11 pi e se resolveram dentro de dois a três dias. Não foi possível isolar o vírus a partir das crostas. Nenhum destes cordeiros soroconverteu ao BoHV-2.

Os exames sorológicos realizados no dia 28 pi revelaram que houve soroconversão ao BoHV-2 nas ovelhas inoculadas, com títulos de anticorpos que variaram entre 2 e 32 (Tabela 2).

As alterações histopatológicas observadas variaram de acordo com a evolução das lesões. As lesões iniciais (dia 5 pi) caracterizadas macroscopicamente por pápulas arredondadas de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, apresentaram edema intercelular epidérmico moderado e múltiplas células isoladas com citoplasma eosinofílico circundadas por um halo claro. Uma área focal extensa de necrose epidérmica, marcada por queratinócitos com citoplasma intensamente eosinofílico e núcleos picnóticos foram observados, além de uma fenda na junção da derme e epiderme, por vezes preenchida por neutrófilos. Nas bordas da área necrosada observou-se um acentuado edema intracelular e degeneração reticular de queratinócitos. Células sinciciais eram abundantes e distribuídas homoganeamente por toda a lesão, além de inclusões eosinofílicas intranucleares em células epiteliais e células sinciciais (Figura 3). Associados com as lesões epidérmicas foram observados neutrófilos dispersos entre as células epiteliais ou formando agregados no interior ou abaixo do estrato córneo. Um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico multifocal, leve a moderado e

predominantemente perivascular foi observado na derme, além de inclusões eosinofílicas intranucleares em células inflamatórias.

Os achados histológicos da lesão papular circundada por vesícula (dia 6 pi) foram semelhantes aos descritos acima. Adicionalmente, uma área de erosão focal e extensa foi observada. A lesão foi marcada por perda parcial e extensa da camada epitelial da epiderme e áreas cobertas por restos celulares e queratina. Os queratinócitos remanescentes apresentavam degeneração balonosa acentuada e raras inclusões eosinofílicas intranucleares. Um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico multifocal e coalescente acentuado, predominantemente perivascular. Células sinciciais e inclusões eosinofílicas intranucleares em células inflamatórias foram raramente observadas na derme.

As lesões recobertas por crostas (dia 8 pi) apresentaram, além do que já havia sido observado nas outras lesões, uma estrutura lamelar eosinofílica e agregados de neutrófilos degenerados na área erodida. Os queratinócitos remanescentes apresentavam degeneração balonosa acentuada. Células sinciciais e inclusões eosinofílicas intranucleares foram raramente observadas. Um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico multifocal e coalescente acentuado, predominantemente perivascular foi observado na derme e também ao redor de glândulas sebáceas e folículos pilosos.

Partículas víricas com morfologia semelhante a herpesvírus foram observadas em biópsias da lesão crostosa coletada da ovelha 126 no dia 8 pi (Figura 4).

DISCUSSÃO

O presente estudo relata a reprodução experimental e caracterização clínico-patológica de mamilite produzida pelo BoHV-2 em ovelhas lactantes. A inoculação cutânea do vírus, após escarificação superficial, resultou em lesões com características clínicas e histológicas

semelhantes às observadas em casos naturais de mamilite herpética em bovinos. Apesar das dificuldades de se isolar o vírus da maioria dos animais, as lesões apresentaram características histológicas típicas da infecção, como a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares e presença de células sinciciais. Além disso, partículas víricas com morfologia de herpesvírus foram observadas nas lesões sob microscopia eletrônica de transmissão. A inoculação de cordeiros pela via nasal também resultou em replicação e excreção viral, e no desenvolvimento de pequenas lesões vesiculares. A tentativa de reativar a infecção latente pela administração de Dx, no entanto, resultou infrutífera, pois nenhum dos cordeiros excretou o vírus ou soroconverteu após o tratamento. Estes resultados confirmam que ovinos são susceptíveis à infecção pelo BoHV-2 e podem desenvolver lesões semelhantes às descritas em bovinos desde que inoculados de forma adequada para permitir a replicação viral no tecido muco-cutâneo.

A infecção e enfermidades causadas pelo BoHV-2 têm sido pouco estudadas, a despeito da ocorrência relativamente freqüente da infecção em rebanhos leiteiros (Dardiri 1973, Gibbs & Rweyemamu 1977). Além da importância clínico-sanitária para a bovinocultura, o BoHV-2 tem sido sugerido como modelo para o HSV, com o qual compartilha diversos aspectos biológicos, antigênicos e moleculares (Sterz et al. 1973, Ehlers et al. 1999, May 2001). As dificuldades de reprodução da enfermidade em bovinos (Gibbs et al. 1973, Castrucci et al. 1978), ovinos e caprinos (Westbury 1981), além da incerteza quanto à via natural de infecção têm se constituído em restrições importantes para o estudo da patogenia da infecção.

Alguns estudos conseguiram reproduzir lesões semelhantes aos casos naturais de mamilite, porém somente após a inoculação endovenosa ou intradérmica (Castrucci et al. 1978, 1979, Martin & Scott 1979). Embora a hipótese de transmissão percutânea por insetos não tenha sido descartada, essa via de transmissão é pouco provável, o que questiona a

validade das inoculações endovenosas e intradérmicas para a reprodução experimental da doença. Da mesma forma, a biologia da infecção latente é muito pouco conhecida, pelas dificuldades de obter a reativação experimental da infecção e de identificar os sítios prováveis de latência. Nesse sentido, o estabelecimento de um modelo animal seria de grande utilidade para o estudo da patogenia da infecção pelo BoHV-2.

A inoculação de cordeiros teve como objetivo avaliar a susceptibilidade desses animais à infecção, e também padronizar a técnica de inoculação, de modo que a infecção se estabelecesse e fosse acompanhada de replicação e excreção viral. Embora a via nasal provavelmente não tenha importância em infecções naturais pelo BoHV-2, essa via representa uma rota atrativa em infecções experimentais, pela facilidade de inoculação e monitoramento da infecção, e também pela variedade de vírus que são capazes de replicar na mucosa nasal. A inoculação dos cordeiros resultou em replicação viral eficiente e excreção em secreções nasais. Foi possível recuperar vírus das secreções de 7/10 dos animais inoculados, embora por um período curto (1 a 3 dias). Os sete animais que excretaram o vírus também desenvolveram sinais de infecção como hiperemia e formação de vesículas, além de corrimento nasal (Tabela 1). Embora infecções naturais do BoHV-2 pela via nasal não tenham sido relatadas, as lesões desenvolvidas pelos cordeiros (vesículas e erosões) são semelhantes às descritas para o BoHV-2 nas tetas e no úbere de vacas (Martin et al. 1966, Deas & Johnston, 1966, Johnston 1971). Ao contrário das lesões desenvolvidas em casos naturais da infecção, lesões recobertas por crostas não foram observadas na mucosa nasal desses cordeiros. No entanto, a dinâmica do desenvolvimento das lesões foi semelhante aos casos naturais e infecções experimentais, com uma rápida resolução na ausência de contaminações secundárias (Martin et al. 1969).

A tentativa de reativar a infecção latente nos cordeiros resultou infrutífera, pois nenhum animal excretou vírus ou soroconverteu após a administração de Dx, parâmetros utilizados como indicadores de reativação (Jones 1998). Em animais inoculados pela via

intradérmica, tentativas de recuperar o vírus dos locais de inoculação após a administração de Dx têm sido freqüentemente fracassadas (Martin & Scott 1979, Castrucci et al. 1983). Somente em animais inoculados pela via endovenosa o vírus pode ser recuperado – de leucócitos - após o tratamento com Dx (Martin & Scott 1979). A dificuldade em reativar o vírus tem contribuído para o pouco conhecimento sobre a biologia da infecção latente pelo BoHV-2. Dentre as possíveis explicações para a falha em isolar o vírus após a administração pode-se considerar: i. ausência de reativação viral; ii. replicação viral deficiente após a reativação, iii. transporte deficiente aos sítios de replicação primários, iv. replicação deficiente nos sítios de replicação primários, v. excreção viral deficiente.

A inoculação das ovelhas teve como objetivo reproduzir a mamilite observada em infecções naturais e caracterizá-la nos aspectos virológicos, clínicos e patológicos. Apesar das lesões desenvolvidas e da soroconversão observada em 6/8 animais, somente foi possível isolar o vírus da lesão de uma ovelha (Tabela 2). Dificuldades de isolamento do vírus de lesões de mamilite herpética têm sido relatadas em vários estudos (Martin et al. 1969, Martin & Scott 1979, Westbury 1981). Em todos eles, somente foi possível isolar o vírus durante a fase exsudativa das lesões, e por um curto espaço de tempo (um a dois dias). O rompimento rápido das vesículas e a dessecação das lesões com formação de crostas dificulta a recuperação de vírus viável (Rweyemamu et al. 1966). Isso contrasta com a relativa facilidade de demonstrar o vírus infeccioso nas secreções nasais dos cordeiros (Tabela 1). É provável que as diferenças histológico-funcionais entre o epitélio nasal (células vivas, presença de secreção) e o epitélio cutâneo das tetas e úbere (camadas superficiais queratinizadas e superfície ressecada), tenham influenciado na replicação, excreção e manutenção da viabilidade do vírus nas lesões. Isso poderia explicar, em parte, a facilidade de isolar o vírus das secreções nasais dos cordeiros, em contraste com a dificuldade de isolamento de vírus das lesões de tetas e úbere.

O curso clínico e as lesões desenvolvidas nas tetas e no úbere de 5/8 das ovelhas inoculadas foram semelhantes às descritas em infecções naturais (Pepper et al. 1966, Yedloutschnig 1970, Johnston 1971, Turner et al. 1974, Alice 1977) e experimentais de bovinos pelo BoHV-2 (Martin & Scott 1979). A inoculação de ovelhas pela via intradérmica também reproduziu lesões semelhantes (Westbury 1981). A exemplo de casos de infecção natural, a presença de vesículas não foi facilmente observada, devido ao seu rápido rompimento e substituição por crostas (Martin et al. 1966). Em infecções naturais, a distribuição das lesões é variável, podendo afetar apenas as tetas, as tetas e úbere, ou somente o úbere (Martin et al. 1966, Rweyemamu et al. 1966, Deas & Johnston 1966). No presente estudo, somente uma ovelha desenvolveu lesão no úbere, ao contrário das outras que desenvolveram lesões em uma ou nas duas tetas.

Os achados histopatológicos foram semelhantes a outros estudos de lesões experimentalmente reproduzidas em bovinos (Martin et al. 1969, Castrucci et al. 1978, Westbury 1981). Histologicamente, as lesões foram caracterizadas por uma reação inflamatória severa inicialmente perivascular que passou a envolver estruturas anexas e toda a derme. Células sinciciais e corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranucleares foram observados freqüentemente nas lesões iniciais (dia 5pi) e se tornaram escassos à medida que a lesão progredia (dia 6 e 8pi). As camadas mais superficiais da pele foram as mais afetadas. Achados semelhantes foram descritos por Martin et al. (1969) e Castrucci et al. (1978) em lesões produzidas após inoculações pelas vias endovenosa e intradérmica em bovinos. Células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos são comuns em lesões iniciais e se tornam escassos à medida que a resolução progride. Da mesma forma, a reação inflamatória inicialmente localizada em torno de vasos se torna disseminada pela derme (Martin et al. 1969, Castrucci et al. 1978). Westbury (1981) observou edema intercelular e infiltrado linfocitário no dia 6 pi em biópsias de pele de ovelhas inoculadas pela via

endovenosa, no entanto, corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos não foram observados em nenhum estágio da infecção. A presença de partículas víricas com morfologia de herpesvírus reforça a participação do vírus na etiopatogenia da lesão.

O desenvolvimento de lesões com características clínico-patológicas semelhantes aos observados em infecções naturais, além da detecção de vírus em suabes e de partículas víricas de herpesvírus nas lesões indicam que a via de inoculação foi adequada para permitir a replicação viral e reprodução da mamilite nos animais inoculados. Esses resultados apontam para o uso potencial de ovelhas para estudos de patogenia da mamilite herpética bovina. O estabelecimento de um modelo animal adequado para o BoHV-2 pode viabilizar o desenvolvimento de vacinas e pesquisas de drogas antivirais contra o HSV, um importante patógeno humano que compartilha diversas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares com o BoHV-2. Drogas antivirais poderiam também ser úteis em casos clínicos de mamilite herpética em gado leiteiro, restringindo a replicação viral, abreviando o curso clínico e reduzindo assim as perdas relacionadas com a redução da produção leiteira dos animais afetados.

Agradecimentos: Ao prof. Cláudio L Barros e ao doutorando Daniel Rissi (UFSM) pelas avaliações histológicas, e ao dr. Severo S. Barros (UFPel) pela realização da microscopia eletrônica de transmissão. Ao Diretor do Biotério Central da UFSM, Médico Veterinário Silvano Noal, pelo alojamento dos animais durante o experimento. Ao CNPq pelos recursos e bolsas (E.F.F. [352386/96-7] e R.W. [520011/95]) são bolsistas PQ do CNPq. S.R.A. e D.G.D possuem bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- Alexander R.A., Plowright W. and Haig D.A. 1957. Cytopathogenic agents associated with lumpy-skin disease of cattle. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* 5:489-492.
- Alice F.J. 1977. Isolamento do vírus da mamilite herpética bovina no Brasil. *Vet. Microbiol.* 8:9-15.
- Castro R.S., Leite R.C., Castro M.E.B., Abreu J.J.& Lobato Z.I.P. 1988. Relato de um surto de “pseudo lumpy skin disease” em novilhas importadas, no estado de Minas Gerais, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 40(4):305-311.
- Castrucci G., Cilli V., Frigeri F., Ferrari M., Ranuci S & Rampichini L 1983. Reactivation of bovid herpesvirus 1 and 2 and parainfluenza-3 virus in calves latently infected. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 6(3):193-199.
- Castrucci G., Ferrari M., Frigeri F., Ranuci S, Cilli V., Tesei B & Rampichini L. 1982. Reactivation in calves of bovid herpesvirus 2 latent infection. *Arch. Virol.* 72:75-81.
- Castrucci G., Frigeri F., Cilli V., Rampichini L., Ranuci S. & Poli G. 1978. Distribution of bovid herpesvirus 2 in calves inoculated intravenously. *Am. J. Vet. Res.* 39(6):943-947.
- Castrucci G., Frigeri F., Cilli V., Rampichini L., Ranuci S., Poli G. & Tesei B. 1979. A study of bovid herpesvirus 2 infection in calves inoculated intradermally or intranasally. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1:277-283.
- Castrucci G., Pedini D.V.M., Cilli V. & Arancia G. 1972. Characterisation of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. *Vet. Rec.* 90:325-335.
- Dardiri A.H. 1973. Comments on bovine mammillitis. *J.A.V.M.A.* 163(7)917-918.
- Dardiri A.H. & Stone S.S. 1972. Serologic evidence of dermatopathic bovine herpesvirus infection of cattle in the United States of America. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health. Assoc.* 76:156-171.

- Deas D.W. & Johnston W.S. 1966. An outbreak of an ulcerative skin condition of the udder and teats of dairy cattle in the east of Scotland. *Vet. Rec.* 78(24):828-829.
- Ehlers B., Goltz M., Elercito M.P., Dasika G.K. & Letchworth G.J. 1999. Bovine herpesvirus type 2 is closely related to the primate alphaherpesviruses. *Virus Genes* 19(3):197-203.
- Flores E. F & Donis R.O. 1995. Isolation and characterization of a bovine cell line resistant to infection with the pestivirus bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Virology* 208:565-575.
- Gibbs E.P.J., Johnson, R.H. & Gatehouse A.G. 1973. Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Res. Vet. Sci.* 14:139-144.
- Gibbs E.P.J. & Rweyemamu M.M. 1977. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. *Vet. Bull.* 47:411-425.
- Haig D.A. 1967. Production of generalised skin lesions in calves inoculated with bovine mammillitis virus. *Vet. Rec.* 80(9):311-312.
- Huygelen C., Thlenpont D. & Vandervelden M. 1960. Isolation of a cytopathogenic agent from skin lesions of cattle. *Nature* 186:979-980.
- Imai K., Ishihara R. & Nishimori T. 2005. First demonstration of bovine herpesvirus 2 infection among cattle by neutralization test in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67(3):317-320.
- Jackson P. 1993. Differential diagnosis of common bovine skin disorders Part 1. In practice. 15(3):119-127.
- Johnston W.S., Wray C. & Scott J.A. 1971. An outbreak of bovine herpes mammillitis in a suckler herd. *Vet. Rec.* 88:372.
- Jones C. 1998. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv. Virus. Res.* 51:81-133.
- Lobato Z.I.P., Trindade G.S, Frois M.C.M., Ribeiro E.B.T, Dias G.R.C., Teixeira B.M., Lima F.A., Almeida G.M.F. & Kroon E.G. 2005. Surto de varíola bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da Mata Mineira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 57(4):424-429.

- Martin W.B. & Gwynne M. 1968 Antibodies to the group II lumpy skin disease virus in the sera of cattle in Kenya. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* 16:217-222.
- Martin W.B., Helen James Z., Lauder I.M., Murray M. & Pirie H.M. 1969. Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 30(12):2151-2166.
- Martin W.B., Martin B., Hay D. & Lauder I.M. 1966. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet. Rec.* 78(14):494-497.
- Martin W.B. & Scott F.M.M. 1979. Latent infection of cattle with herpesvirus 2. *Arch. Virol.* 60:51-58.
- May J.T. 2001. Homology of bovine herpesvirus 2 and herpes simplex virus 1 proteins. *Acta. Virol.* 45:197-199.
- Osorio F.A. Bovine Mammillitis. In: CASTRO, A. E.. HEUSCHELE, W.E.. *Veterinary diagnostic virology: a practitioner's guide*. St Louis: Mosby Year Book, 1992, cap 26, p. 83-85.
- Pepper T.A., Stafford L.P., Jonson R.H. & Osborne A.D. 1966. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet. Rec.* 78(16):569.
- Roizman B. 1992. The family *Herpesviridae*: An update. *Arch. Virol.* 123:425-488.
- Rweyemamu M.M., Johnson R.H. & Tutt J.B. 1966. Some observations on herpesvirus mammillitis of bovine animals. *Vet. Rec.* 79(25):810-811.
- Scott F.M.M. & Martin W.B. 1978. Antibody to bovid herpesvirus 2 in the sera from cattle in the Netherlands. *Vet. Rec.* 102:464.
- Sterz H., Ludwig H. & Rott R. 1973. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. 1973. *Intervirology* 2:1-13.
- Turner A.J., Kovesdy L., Cinater M.S., Nicholls W.A. & Chatham R.O. 1974. Isolation of bovine herpes mammillitis virus from dairy cattle in Victoria. *Aust. Vet. J.* 50:578-579.

Westbury H.A. 1981. Infection of sheep and goats with bovid herpesvirus 2. Res. Vet. Sci. 31:353-357.

Yedloutschnig R.J., Hess J.W.R., Dardiri A.H., Taylor W.D., Barnes D.M., Page R.W. & Ruebke H.J. 1970. Bovine herpes mammillitis-like disease diagnosed in the United States. Proc Annu Meet U S Anim. Health. Assoc. 74:208-212

Tabela 1 – Excreção viral, curso clínico e resposta sorológica durante a infecção aguda e após a administração de dexametasona em cordeiros inoculados na mucosa nasal com o herpesvírus bovino tipo 2.

Animal	Infecção aguda					Pós-dexametasona				
	Excreção viral ^a	Sinais clínicos	Anticorpos neutralizantes (dias)			Excreção viral	Sinais clínicos	Anticorpos neutralizantes (dia)		
			0	14	28			0	14	28
101	- ^b	s ^c	<2 ^d	4	2	-	-	2	2	2
102	-	s	<2	8	2	-	s	2	4	2
104	-	s	<2	2	2	-	s	4	2	2
106	8 (1)	s, v ^e , e ^f	<2	2	2	-	s	2	2	≤2
110	5 (2)	s, v, e	<2	8	2	-	s	2	2	≤2
128	2 (2)	s, v, e	<2	2	8	-	-	8	8	8
132	2 (3)	s, v, e	<2	4	8	-	s	8	8	16
134	2 (3)	s, v, e	<2	2	2	-	s	4	2	2
135	3 (2)	s, v, e	<2	8	8	-	s	8	16	16
137	3 (1)	s, v, e	<2	8	8	-	-	16	8	16
Controle	-	-	<2	<2	<2	-	-	<2	<2	<2

^a Início da excreção (dpi) e (duração)

^b Resultado negativo no isolamento

^c Secreção nasal aumentada

^d Anticorpos neutralizantes não detectados na menor diluição testada (1:2)

^e Vesículas

^f Exsudação

Tabela 2 – Excreção viral, curso clínico e resposta sorológica durante a infecção aguda em ovelhas lactantes inoculadas na pele das tetas e do úbere com o herpesvírus bovino tipo 2.

Animal	Excreção viral ^a	Infecção aguda						Anticorpos neutralizantes (dia)		
		Sinais clínicos (dia)						0	14	28
		0-4 ^b	5	6	7	8				
108	7 (2)	-	-	h ^c , e ^d , p ^e	h, e, c ^f	h, e, c	<2 ^g	16	8	
116	- ^b	-	-	h, e, p	h, e, c	h, e, c	<2	8	16	
118	-	-	-	-	-	-	<2	2	<2	
138	-	-	-	h, v ^h	h, c	c	<2	<2	2	
159	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	
SN	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	
126	-	h, p	h, p	h, c	c	-	<2	32	16	
166	-	-	h, p	h, e, p, v	h, e, c	h, e, c	<2	32	nt ⁱ	

^a Início da excreção (dpi) e (duração)

^b Resultado negativo no isolamento

^c Hiperemia

^d Edema

^e Pápula

^f Crosta

^g Anticorpos neutralizantes não detectados na menor diluição testada (1:2)

^h Vesícula

ⁱ Não testado



Fig. 1. Sinais clínicos observados em cordeiros inoculados com o herpesvírus bovino tipo 2 na mucosa nasal. (A) Cordeiro 135 (dia 8 pi): secreção mucopurulenta; (B) Cordeiro 132 (dia 7 pi): hiperemia, vesícula (seta) e erosão (cabeça de seta) .

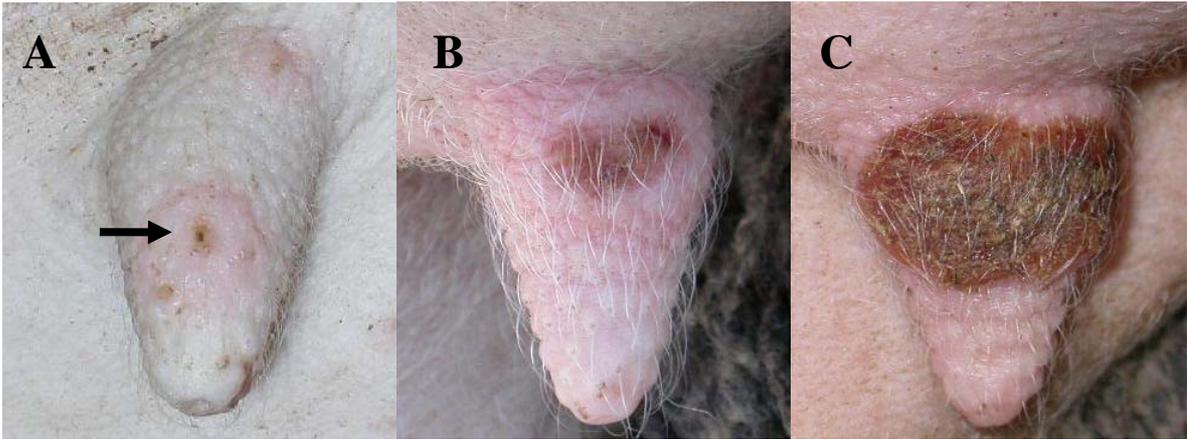


Fig. 2. Sinais clínicos observados nas tetas de ovelhas lactantes inoculadas com o herpesvírus bovino tipo 2. **(A)** Ovelha 126 (dia 6 pi): hiperemia, pápula e vesícula (seta); **(B)** Ovelha 108 (dia 7 pi): hiperemia, edema e início da formação de crostas, e **(C)** hiperemia, edema e crostas (dia 12 pi).

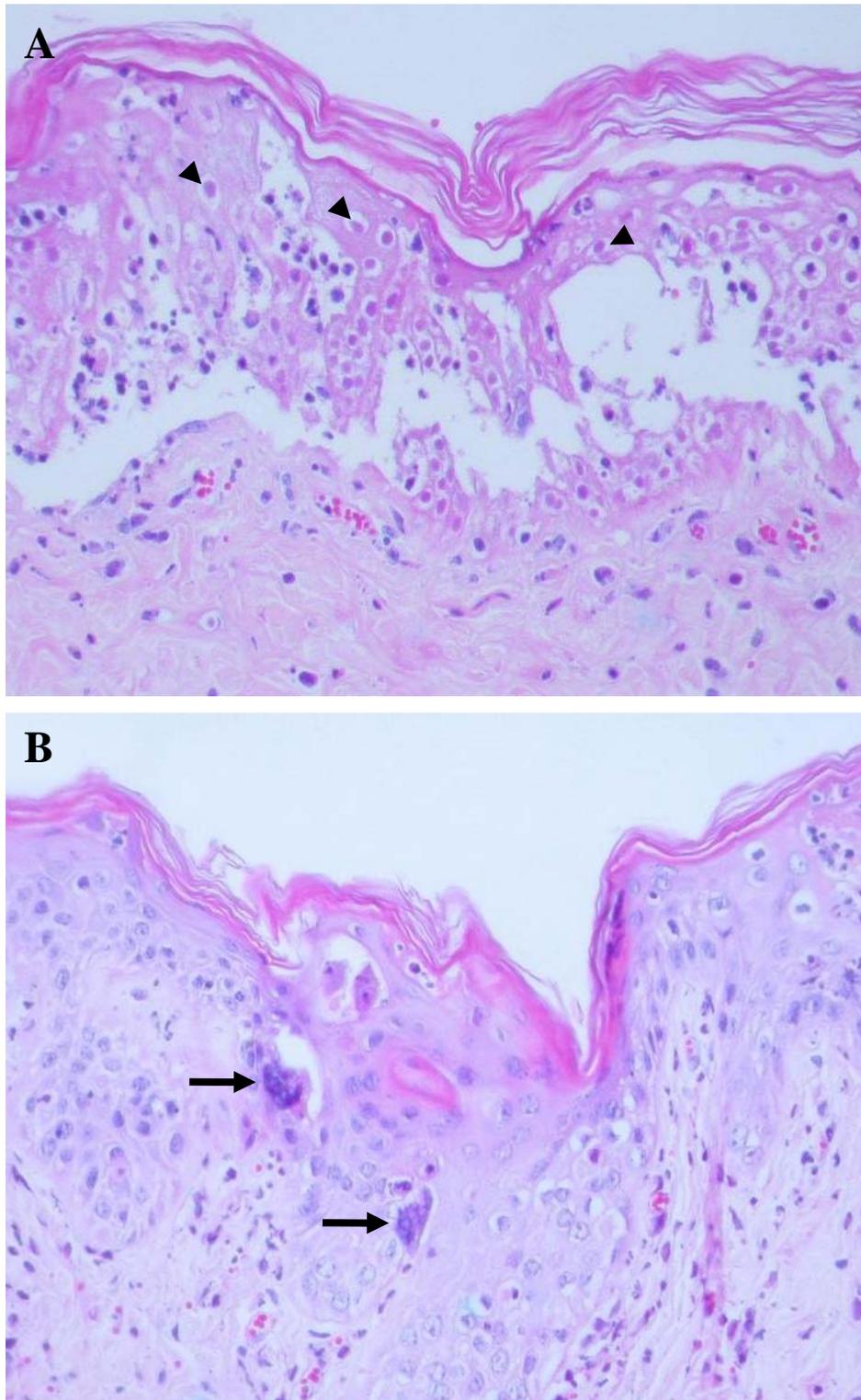


Fig. 3. Corte histológico da pele do úbere da ovelha 126 inoculada com o herpesvírus bovino tipo 2. (A) Área focal e extensa de necrose epidérmica e infiltrado de células inflamatórias, com formação de uma fenda na junção dermoepidérmica. São também observadas numerosas inclusões eosinofílicas intranucleares em células epiteliais (cabeça de setas). (B) Duas células sinciciais estão presentes na epiderme (setas) e há infiltrado inflamatório misto na derme superficial. HE, obj.40.

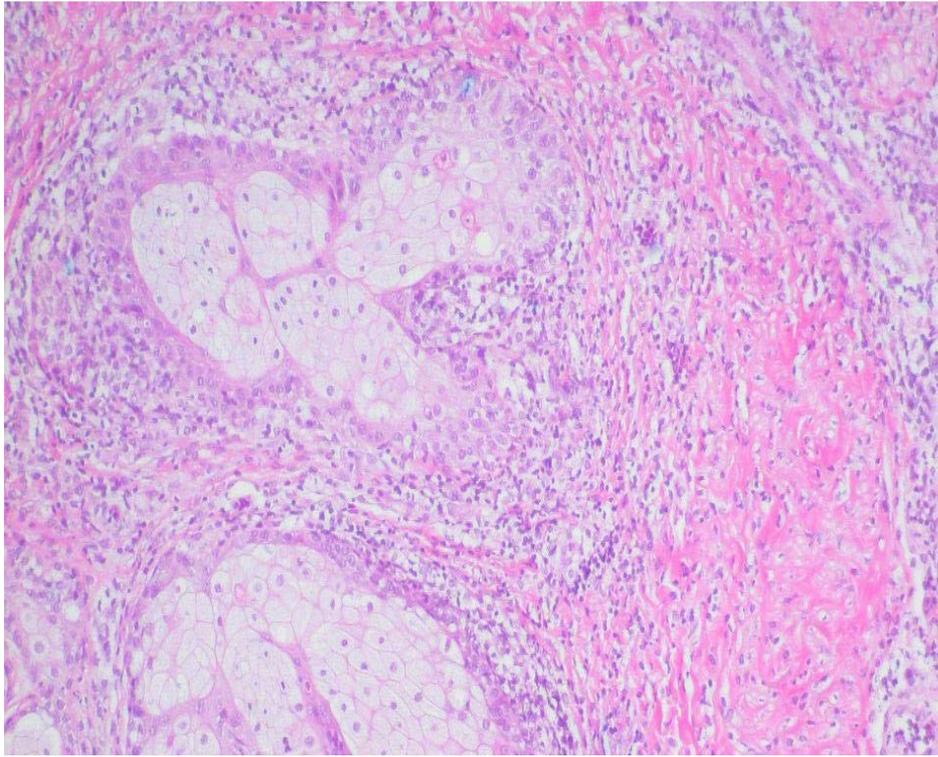


Fig. 4. Corte histológico de pele da teta da ovelha 126 inoculada com o herpesvírus bovino tipo 2. Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico na derme profunda e ao redor de estruturas anexas (glândulas sebáceas). HE, obj.20.

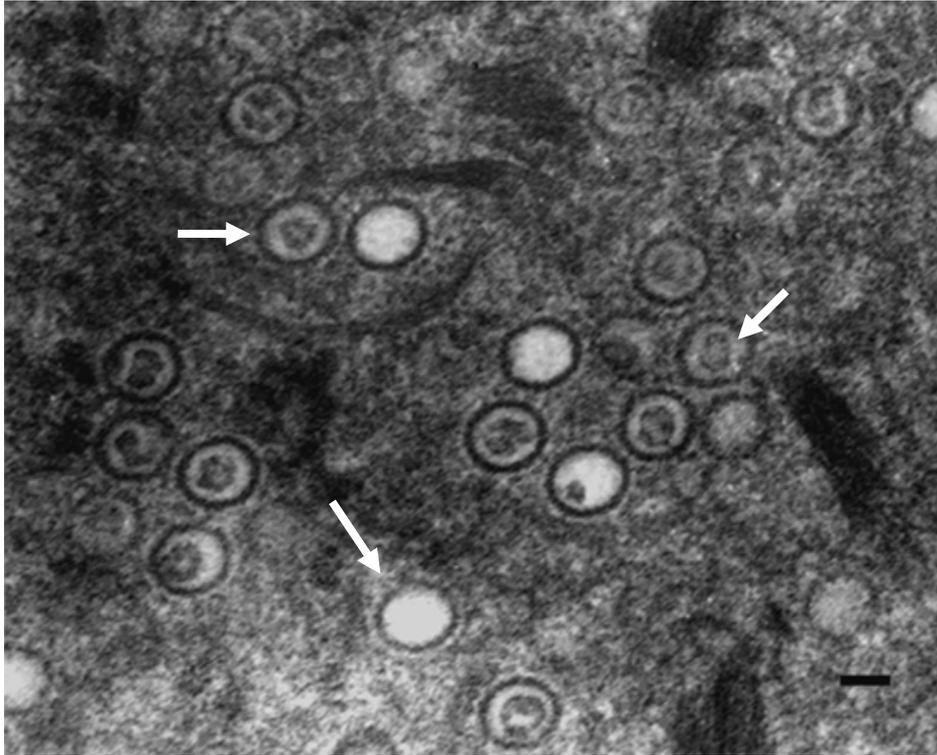


Fig. 5. Fotomicrografia de lesão crostosa da ovelha 126 inoculada com o herpesvírus bovino tipo 2. Em meio a detritos celulares observam-se vários vírions com morfologia compatível com herpesvírus (setas). Barra=100 nm.

3. CONCLUSÕES

- Cordeiros são susceptíveis à infecção pelo BoHV-2 e desenvolvem lesões vesiculares e ulceradas após inoculação na mucosa nasal.
- Ovelhas lactantes são susceptíveis à infecção pelo BoHV-2 e desenvolvem lesões caracterizadas por hiperemia, edema, pápula, vesículas, exsudação e crostas quando inoculadas nas tetas e no úbere.
- As características clínicas e histológicas da infecção experimental de ovelhas lactantes com o BoHV-2 são semelhantes às observadas em casos naturais e infecções experimentais de bovinos.

4. REFERÊNCIAS

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da mamilite herpética bovina no Brasil. **Vet. Microbiol.**, v. 8, p. 9-15, 1977.

ALMEIDA, S.R. [Informe verbal] Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, n 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900 Email: sarial@ig.com.br

CASTRO, R.S et al. Relato de um surto de “pseudo lumpy skin disease” em novilhas importadas, no estado de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 40, n. 4, p. 305-311, 1988.

CASTRUCCI, G. et al. Characterisation of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. **Vet. Rec.**, v. 90, p. 325-335, 1972.

CASTRUCCI, G. et al. Distribution of bovid herpesvirus 2 in calves inoculated intravenously. **Am. J. Vet. Res.**, v. 39, n. 6, p. 943-947, 1978.

CASTRUCCI, G. et al. A study of bovid herpesvirus 2 infection in calves inoculated intradermally or intranasally. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 1, p. 277-283, 1979.

CASTRUCCI, G. et al. A study in calves of an immunologic relationship between herpes simplex virus and bovid herpesvirus 2. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 1981.

CASTRUCCI, G. et al. Response of calves previously inoculated with inactivated herpes simplex vírus to challenge exposure with bovid herpesvirus 2. **Microbiologica**, v. 7, p. 171-178, 1984.

GIBBS, E.P.J.; JOHNSON, R.H.; GATEHOUSE, A.G. Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis. **Res. Vet. Sci.**, v. 14, p.139-144, 1973.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. **Vet. Bull.**, v. 47, p. 411-425, 1977.

HAIG, D.A. Production of generalised skin lesions in calves inoculated with bovine mammillitis virus. **Vet. Rec.**, v. 80, n. 9, p. 311-312, 1967.

HUYGELEN, C.; THLENPONT, D.; VANDERVELDEN, M. Isolation of a cytopathogenic agent from skin lesions of cattle. **Nature**, v. 186, p. 979-980, 1960.

IMAI, K.; ISHIHARA, R.; NISHIMORI, T. First demonstration of bovine herpesvirus 2 infection among cattle by neutralization test in Japan. **J. Vet. Med.Sci.**, v. 67, n. 3, p. 317-320, 2005.

KREUTZ, L.C. [Informe verbal] Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Campus I, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99001-970 Email: lckreutz@upf.tche.br.

MARTIN, W.B.; GWYNNE, M. Antibodies to the group II lumpy skin disease virus in the sera of cattle in Kenya. **Bull. Epizoot. Dis. Afr.**, v. 16, p. 217-222, 1968.

MARTIN, W.B. et al. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. **Vet. Rec.**, v. 78, n. 14, p. 494-497, 1966.

MARTIN, W.B. et al. Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 30, n. 12, p. 2151-2166, 1969.

MARTIN W.B. & SCOTT F.M.M. Latent infection of cattle with herpesvirus 2. **Arch. Virol.**, v. 60, p: 51-58, 1979.

O'CONNOR, M. Cultivation of bovine herpesvirus 2 by incubation at reduced temperature. **Vet. Rec.**, v. 117, p. 637, 1985.

PEPPER, T.A. et al. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. **Vet. Rec.**, v. 78, n. 16, p. 569, 1966.

RWEYEMAMU M.M.; GIBBS E.P.J. Bovine herpesvirus. Part II. Bovine herpesvirus 2 and 3. **Vet. Bull.**, v. 47, n. 6, p. 411-425, 1977.

ROIZMANN, B. The family *Herpesviridae*: An update. **Arch. Virol.**, v. 123, p. 425-488, 1992.

SMEE, D.F.; LEONHARDT, J.A. Vaccination against bovine herpes mammillitis virus infections in guinea pigs. **Intervirology**, v. 37, p. 20-24, 1994.

STERZ, H.; LUDWIG, H.; ROTT, R. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. **Intervirology**, v. 2, p. 1-13, 1973.

TURNER, A.J. et al. Isolation of bovine herpes mammillitis virus from dairy cattle in Victoria. **Aust. Vet. J.**, v. 50, p. 578-579, 1974.

WESTBURY, H.A. Infection of sheep and goats with bovid herpesvirus 2. **Res. Vet. Sci.**, v. 31, p. 353-357, 1981.

YEDLOUTSCHNIG, R.J. et al. Bovine herpes mammillitis-like disease diagnosed in the United States. **Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health. Assoc.** v. 74, p. 208-212, 1970.