

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

**PATOGENIA DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 5 EM CAPRINOS E COELHOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diego Gustavo Diel

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**PATOGENIA DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS BOVINO
TIPO 5 EM CAPRINOS E COELHOS**

Por

Diego Gustavo Diel

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

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS, Brasil
2007

**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

**PATOGENIA DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5
EM CAPRINOS E COELHOS**

Elaborada por
Diego Gustavo Diel

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/Orientador)

Luizinho Caron, Dr, IRFA

Valéria Maria Lara Carregaro, Dra, UFSM

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais, Celso e Nair, pelo exemplo que sempre foram para mim, pelo apoio incondicional, pela compreensão e pelo esforço que fizeram para garantir a minha formação profissional.

Aos meus irmãos Rocheli e Gabriel e a minha esposa Camila pela paciência, compreensão e companheirismo demonstrados em todos os momentos durante esta árdua jornada.

Aos professores Eduardo Furtado Flores e Rudi Weiblen pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade demonstrada durante esses anos de convivência e acima de tudo, pelo exemplo profissional e pessoal.

Aos colegas e amigos do Setor de Virologia pelo auxílio com os experimentos, pelos momentos de descontração e pela enorme amizade que foi construída durante o curso.

A todos os professores do PPGMV que de uma maneira ou de outra contribuíram para a minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

A Universidade Federal de Santa Maria, por me acolher e proporcionar uma excelente formação profissional.

RESUMO

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

PATOGENIA DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM CAPRINOS E COELHOS

AUTOR: DIEGO GUSTAVO DIEL
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, 23 de fevereiro de 2007.

O presente estudo descreve aspectos da patogenia da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em caprinos e coelhos. O estudo em caprinos teve como objetivo investigar a susceptibilidade da espécie ao BoHV-5, devido ao seu possível papel como reservatório do vírus. Para isto, caprinos jovens foram inoculados pela via intranasal (IN) com três isolados brasileiros do BoHV-5 (SV-507, G1; SV-609, G2; e EVI-88, G3) e monitorados nos aspectos virológicos, clínicos e sorológicos. A fase aguda caracterizou-se por excreção viral em secreções nasais por um período de até 14 dias pós-inoculação (pi) em títulos de até $10^{5,97}$ DICC₅₀/mL, sinais respiratórios brandos e soroconversão. No dia 60 pi, dois animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para a coleta de tecidos e pesquisa de DNA viral. Os animais restantes foram submetidos à administração de dexametasona (Dx), na tentativa de reativar a infecção latente. A administração de Dx resultou em reativação da infecção latente em 75% (9/12) animais, detectada pela excreção viral (8/12) e/ou soroconversão (3/12). O DNA viral latente foi detectado no gânglio trigêmeo (TG) e/ou no bulbo olfatório (BO) de todos os animais eutanasiados nos dias 60 pi e 40 pós-dexametasona. Esses resultados demonstram que caprinos são susceptíveis a infecção aguda e latente pelo BoHV-5 e podem excretar vírus durante a reativação da infecção. Portanto, essa espécie pode ser considerada um potencial reservatório do BoHV-5 em áreas onde caprinos e bovinos são criados conjuntamente. O segundo experimento teve como objetivo investigar a importância da via olfatória na invasão do encéfalo de coelhos pelo BoHV-5. Para isto, coelhos recém desmamados foram previamente submetidos à ablação cirúrgica do BO e inoculados pela via IN ou conjuntival (IC) com a cepa SV-507 do BoHV-5. A inoculação IN resultou no desenvolvimento de doença neurológica em 100% dos animais controle (com BO), com início dos sinais clínicos entre os dias 5 e 10 pi. No grupo submetido à ablação do BO apenas um animal (9,1%) apresentou sinais neurológicos (início dia 17 pi). Após a inoculação IC, 10/12

(83,3%) coelhos controle (com BO) desenvolveram doença neurológica com o início dos sinais entre os dias 11 e 20 (média 15,3 dias); 10/12 coelhos (83,3%) sem o BO também desenvolveram a doença neurológica, com os sinais iniciando entre os dias 9 e 15 pi (média 12,5 dias). Esses resultados demonstram que tanto a via olfatória como a via trigeminal podem ser utilizadas pelo BoHV-5 para invadir o SNC de coelhos após infecção experimental. Porém, o transporte pela via olfatória é mais rápido e mais eficiente enquanto que a via trigeminal atua como via de acesso mais lento e menos eficiente. Esses resultados são importantes para um melhor conhecimento sobre a neuropatogênese das infecções pelos alfa herpesvírus.

Palavras-chave: BoHV-5, patogenia, infecção experimental, caprinos, coelhos.

ABSTRACT

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

PATHOGENESIS OF INFECTION BY BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 IN GOATS AND RABBITS

AUTHOR: DIEGO GUSTAVO DIEL
ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, February, 23rd, 2007.

This study describes aspects of the pathogenesis of bovine herpesvirus-5 (BoHV-5) infection in goats and rabbits. The study performed in goats was aimed at investigating the susceptibility of this species to BoHV-5 infection, due its potential role as a virus reservoir. Young goats were inoculated intranasally with three Brazilian BoHV-5 isolates (SV-507, G1; SV-609, G2; and EVI-88, G3) and monitored thereafter regarding to virus shedding, clinical signs and antibody response. The acute infection was characterized by virus shedding in nasal secretions for up to 14 days post-inoculation (pi) in titers reaching up to $10^{5.97}$ TCID₅₀/mL, mild respiratory signs and seroconversion. At day 60 pi, two animals of each group were euthanized for tissue collection to search viral DNA. The remaining animals were submitted to dexamethasone (Dx) administration to reactivate latent infection. Dx treatment resulted in virus reactivation in 75% (9/12) animals, as ascertained by virus shedding (8/12), and/or seroconversion (3/12). Latent viral DNA was detected in the trigeminal ganglia (TG) and/or in the main olfactory bulb (MOB) of all goats euthanized at days 60 pi and 40 post-dexamethasone. These results demonstrate that goats are susceptible to BoHV-5 acute and latent infection and may shed virus upon reactivation of latency. Thus, this species should be considered a potential reservoir for BoHV-5 in areas where goats and cattle are raised in close contact. The second experiment was aimed at investigating the role of the olfactory pathway in the transport of BoHV-5 to the brain of rabbits. For this, thirty days-old rabbits had the MOB surgically removed and were subsequently inoculated intranasally (IN) or conjunctivally (IC) with the strain SV-507 of the BoHV-5. Intranasal inoculation resulted in neurological disease in 100% of the control animals (with MOB), with clinical signs starting between days 5 and 10 pi; in the group submitted to MOB ablation only one animal (9.1%) developed neurological signs (started at day 17 pi). Following IC inoculation 10/12 (83.3%)

control rabbits (with MOB) developed neurological disease with clinical signs starting between days 11 and 20 (mean 15.3 days). Furthermore, 10/12 rabbits lacking the MOB also developed neurological disease starting between days 9 and 15 pi (mean 12.5 days). These results demonstrate that both the olfactory and the trigeminal pathways may be used by BoHV-5 to invade the brain of rabbits after experimental infection. The transport by the olfactory pathway is faster and more efficient, while the trigeminal transport is slower and less efficient. These results add important information to the knowledge about the neuropathogenesis of alphaherpesvirus infection.

Key words: BoHV-5, pathogenesis, experimental infection, goats, rabbits.

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 (Fig. 1) – Virus shedding in nasal secretions by goats experimentally infected with three Brazilian isolates of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) during acute infection (A); and after dexamethasone administration (B). The dots represent the mean viral titers for each day, expressed as log₁₀ TCID₅₀/mL. The arrows represent the day of inoculation (0 pi), the first (60 pi) and last (65 pi) day of dexamethasone administration 36
- FIGURA 2 (Fig. 2) – Detection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) DNA in neural tissues of experimentally infected goats. Panel A – tissues collected from animals euthanized at day 60 post inoculation: Lane 1. Molecular weight marker; 2. Positive control; 3. Negative control; 4. Trigeminal ganglia (TG) of animal # 66; 5. Olfactory bulb (OB) of animal # 66; 6. TG of animal # 01; 7. OB of animal # 01; 8. TG of animal # 05; 9. OB of animal # 05; 10. No template; and 11. Molecular weight marker. Panel B – tissues collected from animals euthanized at day 40 post-dexamethasone administration: Lane 1. Molecular weight marker; 2. Positive control; 3. Negative control; 4. TG of animal # 69; 5. OB of animal # 69; 6. TG of animal 02; 7. OB of animal # 02; 8. TG of animal 08; 9. OB of animal 08; 10. No template; and 11. Molecular weight marker. Agarose gel (1%) stained with ethidium bromide and visualized under UV light 37

LISTA DE TABELAS

2. CAPÍTULO 1

TABELA 1 (Table 1) - Viral shedding in nasal secretions and virus neutralizing antibodies during acute phase in goats experimentally infected with three bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolates (SV-507, SV-609 and EVI-88).....	34
TABELA 2 (Table 2) - Viral shedding in nasal secretions and virus neutralizing antibodies after dexamethasone administration in goats experimentally infected with three Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolates (SV-507, SV-609 and EVI-88).....	35

3. CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Achados virológicos e clínicos em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 submetidos ou não à ablação prévia do bulbo olfatório.....	55
TABELA 2 – Resumo do curso clínico, morbidade e mortalidade em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. CAPÍTULO 1. ACUTE AND LATENT INFECTION BY BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 (BoHV-5) IN EXPERIMENTALLY INFECTED GOATS.....	15
Abstract.....	16
1. Introduction.....	16
2. Materials and Methods.....	19
3. Results.....	22
4. Discussion.....	25
5. References.....	30
3. CAPÍTULO 2. O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 (BoHV-5) PODE UTILIZAR AS ROTAS OLFATÓRIA E TRIGEMINAL PARA INVADIR O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE COELHOS, DEPENDENDO DA VIA DE INOCULAÇÃO.....	38
Abstract.....	39
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	44
Resultados.....	46
Discussão.....	48
Referências.....	52
4. CONCLUSÕES.....	57
5. REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Os membros da família *Herpesviridae* são vírus DNA, envelopados que co-evoluíram com os seus hospedeiros. Essa família possui aproximadamente 200 vírus isolados de diversas espécies incluindo moluscos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (ROIZMAN & PELLET, 2001). A subfamília *Alphaherpesvirinae* abriga importantes patógenos de humanos e de animais, incluindo os vírus do herpes simplex humano 1 e 2 (HSV-1 e 2), o vírus da varicela zoster (VZV), os herpesvírus bovino 1 e 5 (BoHV-1 e 5), o vírus da doença de Aujeszky (PRV), o herpesvírus caprino 1 (CpHV-1), entre outros. Os membros dessa subfamília caracterizam-se por apresentarem um ciclo replicativo curto e disseminação rápida em células de cultivo, por possuírem um amplo espectro de hospedeiros e pela capacidade de estabelecerem infecções latentes em gânglios sensoriais e autonômicos (ROIZMAN et al., 1992). A habilidade de estabelecer e de reativar infecções latentes constitui-se na principal propriedade biológica desses agentes, uma vez que permite a sua manutenção na natureza (ROCK, 1994).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um alfaherpesvírus responsável por surtos de meningoencefalite, principalmente em bovinos jovens (BAGUST & CLARK, 1972). Os sinais clínicos associados com a infecção incluem tremores, andar em círculos, bruxismo, nistagmo, opistótono e recumbência seguida de convulsões, movimentos de pedalagem e freqüentemente morte (CARRILLO et al., 1983). A origem, a prevalência e a distribuição da infecção pelo BoHV-5 são desconhecidas. Isso se deve principalmente a imprecisão histórica na classificação do agente, à extensa reatividade sorológica cruzada com o BoHV-1 e à falta de reagentes específicos para a sua identificação (BULACH & STUDDERT, 1990). Desde 1962, vários surtos de encefalite herpética tem sido relatados em bovinos e posteriormente foram atribuídos ao BoHV-5. Casos de meningoencefalite herpética já foram descritos na Austrália (JOHNSTON et al., 1962), Itália (BARENFUS et al., 1963), Hungria (BARTHA et al., 1969); e Estados Unidos (EUGSTER et al., 1974; d'OFFAY et al., 1993; d'OFFAY et al., 1995). No entanto, a infecção e enfermidade neurológica associadas com o BoHV-5 são mais freqüentes em países da América do Sul, como o Brasil e Argentina, onde vários surtos têm sido relatados (RIET-CORRÊA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989; CARRILLO et al., 1983; ROEHE et al., 1997; SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RIET-CORRÊA et al., 2006; RISSI et al., 2006). Devido a ocorrência esporádica e a alta taxa

de mortalidade associada com a infecção pelo BoHV-5, tem sido sugerido que o agente possa ter origem em zebuínos ou em outra espécie de ruminante (BULACH & STUDDERT, 1990).

Uma característica dos alfaherpesvírus, que pode ter importantes implicações epidemiológicas, é o seu amplo espectro de hospedeiros susceptíveis (ROIZMAN, 1992). Existem várias evidências da capacidade desses vírus de cruzar a barreira inter-espécies e infectar espécies relacionadas. Infecção natural pelo BoHV-1 já foi relatada em caprinos com sinais neurológicos, e posteriormente o vírus foi reativado pela administração de dexametasona em animais do mesmo rebanho (TOLARI et al., 1990). Anticorpos contra o BoHV-1 também já foram detectados em caprinos no Brasil (CASTRO et al., 1996) e na Turquia (YESILBAG et al., 2003). Além disso, evidências sorológicas da infecção pelo BoHV-1 em ruminantes silvestres foram relatadas na França e na Bélgica (THIRY et al., 1988), nos EUA (FULTON et al., 1982; AGUIRRE et al., 1995), no Brasil (LAGE et al., 1996), e no Canadá (JORDAN et al., 2003). Evidências da infecção natural de ovinos pelo BoHV-5 também foram demonstradas pela detecção de anticorpos específicos para o agente utilizando-se um teste de ELISA (LINDNER et al., 1993).

Além das evidências de infecção natural, infecções experimentais de espécies heterólogas com os alfaherpesvírus também têm sido realizadas com sucesso. A inoculação de caprinos com o BoHV-1 resultou no desenvolvimento de sinais respiratórios brandos e soroconversão, com a subsequente reativação da infecção latente após a administração de dexametasona (SIX et al., 2001). Além disso, bovinos inoculados com o CpHV-1 também excretaram o vírus em secreções nasais e soroconverteram (SIX et al., 2001). Infecções experimentais realizadas com o BoHV-1 em ovinos também demonstraram a susceptibilidade desta espécie ao agente (HAGE et al., 1997). O BoHV-5 demonstrou ser capaz de produzir enfermidade neurológica em ovinos (BELÁK et al., 1999; SILVA et al., 1999), bem como de reativar da infecção latente após a administração de dexametasona (SILVA et al., 1999).

O BoHV-1 e o BoHV-5 são estreitamente relacionados com outros herpesvírus de ruminantes, incluindo o CpHV-1, o herpesvírus bubalino 1 (BuHV-1) e os herpesvírus cervídeo tipos 1 e 2 (CvHV-1 e 2) (THIRY et al., 2006). A reatividade sorológica cruzada, associada com a possibilidade dos alfaherpesvírus se disseminarem entre as populações de ruminantes constituem-se em ameaças potenciais aos programas de controle e erradicação do BoHV-1 (THIRY et al., 2006). Espécies que potencialmente possam ser infectadas pelo BoHV-1 podem servir de reservatórios para o vírus e contribuir para a sua manutenção na natureza (SIX et al., 2001). Entretanto, a importância epidemiológica de outra espécie, que não a bovina, na manutenção do BoHV-1/5 na natureza permanece controversa (ENGELS et

al., 1992; HAGE et al., 1997; SIX et al., 2001; ACKERMANN & ENGELS, 2006; THIRY et al., 2006) e vem sendo alvo de vários estudos (HAGE et al., 1997; BELÁK et al., 1999; SIX et al., 2001).

A patogenia da infecção pelo BoHV-5 e a via utilizada pelo agente para invadir o sistema nervoso central (SNC) ainda não estão completamente elucidadas. No entanto, estudos realizados em camundongos com o HSV-1 e com o PRV indicam que, após a replicação primária nos locais de penetração, esses vírus invadem as terminações nervosas e são transportados no sentido retrógrado até o SNC, onde replicam e causam meningoencefalite (UGOLINI et al., 1987; CARD et al., 1990). Após a infecção com o BoHV-5, que pode iniciar na cavidade nasal e/ou ocular, o vírus replica na mucosa nasal e/ou na conjuntiva ocular e subseqüentemente invade o SNC, utilizando as terminações nervosas regionais (BELKNAP et al., 1994). A invasão do SNC a partir dos sítios de replicação primária pode potencialmente ocorrer por diferentes categorias de neurônios responsáveis pela inervação da mucosa nasofaríngea e/ou da conjuntiva ocular, entre eles: i. Neurônios bipolares localizados no epitélio olfatório, que possuem dendritos em contato direto com o meio externo e seus axônios se projetam para vários grupos de neurônios localizados principalmente no bulbo olfatório (SWITZER et al., 1985); ii. Neurônios sensoriais pseudounipolares do gânglio trigêmeo que fazem conexão com o núcleo pontino e espinhal na ponte e medula oblonga, respectivamente (TRACEY et al., 1985); iii. Neurônios motores parassimpáticos do gânglio pterigopalatino, que possuem conexões axonais com o núcleo salivar posterior na medula oblonga (SPENCER et al., 1990); ou ainda por iv. Neurônios do sistema nervoso simpático cujos corpos celulares estão localizados no gânglio cervical (BABIC et al., 1994).

O HSV, o PRV e o vírus da raiva são transportados até o SNC tanto pela via olfatória (i.e. nervo olfatório) como pela via trigeminal (i.e. ramo maxilar e/ou oftálmico do nervo trigêmeo) (STROOP et al., 1984; LAFAY et al., 1991; BABIC et al., 1994; KRITAS et al., 1994). Infecções experimentais realizadas em coelhos sugerem que o BoHV-5 é transportado de forma mais eficiente pela via olfatória quando comparada com a via trigeminal (CHOWDHURY et al., 1997; BELTRÃO et al., 2000). Em outros experimentos, a via trigeminal pareceu não estar envolvida no transporte do BoHV-5 até o SNC, uma vez que antígenos virais não foram detectados de maneira consistente nos neurônios do gânglio trigêmeo (LEE et al., 1999). A distribuição das lesões no encéfalo de bovinos natural ou experimentalmente infectados com o BoHV-5 fortalece a hipótese de que a principal via utilizada pelo agente para invadir o SNC é a via olfatória (BELKNAP et al., 1994; RISSI et

al., 2006). No entanto, o papel da via trigeminal no transporte do BoHV-5 até o SNC não pode ser descartado, uma vez que o gânglio trigêmeo constitui-se no principal sítio de infecção latente desse agente (ROIZMAN et al., 1992; ROCK, 1994; VOGEL et al., 2003).

O presente trabalho descreve dois experimentos realizados com o BoHV-5, em caprinos e coelhos. A inoculação experimental de caprinos teve como objetivo investigar a susceptibilidade dessa espécie à infecção aguda e latente pelo BoHV-5. O experimento realizado em coelhos teve como objetivo investigar a importância da via olfatória no acesso do BoHV-5 ao encéfalo após infecção experimental. Nesta dissertação os dois experimentos serão apresentados separadamente sob a forma de capítulos:

- 2. CAPÍTULO 1: Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats.

- 3. CAPÍTULO 2: 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.

2. CAPÍTULO 1

Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats.

D.G. Diel, S.R. Almeida, M.C.S. Brum, R. Dezengrini, R. Weiblen, E.F. Flores*

(Artigo aceito para publicação na revista *Veterinary Microbiology* – 2007).

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil. *Corresponding author: Tel./Fax: +55 55-3220-8034; *E-mail address*: flores@ccr.ufsm.br (E.F Flores).

Abstract

The ability of alphaherpesviruses to infect different ruminant species may have important implications for control/eradication efforts. Serological data indicate that goats may be naturally infected with bovine herpesviruses. To investigate the susceptibility of goats to bovine herpesvirus-5 (BoHV-5), three to four-months-old kids were inoculated intranasally with each of three Brazilian BoHV-5 isolates (G1, n=8; G2, n=5; G3, n=5). The acute infection was characterized by virus shedding in nasal secretions for up to 14 days (titers up to $10^{5.97}$ TCID₅₀/mL), mild respiratory signs and conjunctivitis. All animals seroconverted to BoHV-5, developing virus neutralizing (VN) titers from 4 to 32 to the homologous viruses. At day 60 post-inoculation (pi), two animals from each group were euthanized for tissue collection and the remaining goats were submitted to dexamethasone administration ($0.4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 5 days). Dexamethasone treatment resulted in virus reactivation in nine out of 12 animals, as ascertained by virus shedding and/or by increase in VN titers. Virus shedding was detected in 8/12 animals and lasted from one to nine days. Latent viral DNA was detected by PCR in the olfactory bulb and/or trigeminal ganglia of 6/6 goats euthanized at day 60pi and in 12/12 animals euthanized 40 days post-dexamethasone. These results show that young goats are susceptible to BoHV-5 and may shed virus upon reactivation of latent infection. Thus, it is reasonable to expect that goats raised in close contact with cattle in areas where BoHV-5 is endemic may be infected and therefore should be considered potential reservoirs of the virus.

Keywords: BoHV-5, epidemiology, eradication, reservoirs.

1. Introduction

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is an alphaherpesvirus associated with meningoencephalitis in cattle (Studdert, 1989). BoHV-5 is an enveloped, double stranded DNA virus, classified within the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus

Varicellovirus (Roizman, 1992). Clinical signs associated with BoHV-5 infection include tremors, circling, bruxism, opisthotonus, nystagmus, incoordination, recumbency followed by convulsions, paddling and death (Carrillo et al., 1983). Like other alphaherpesviruses, BoHV-5 establishes a lifelong latent infection in sensory nerve ganglia after acute infection (Vogel et al., 2003). Occasional reactivation of latent infection provides an adequate means of viral transmission and spread (Rock, 1994).

The origin and geographic distribution of BoHV-5 infection are largely unknown, mainly due to its serological cross-reactivity with BoHV-1 (Vogel et al., 2002). Sporadic cases of meningoencephalitis by BoHV-5 have been reported in Australia (Johnston et al., 1962), USA (Eugster et al., 1974), Italy (Moretti et al., 1964) and Hungary (Bartha et al., 1969). In contrast, BoHV-5 infection and disease appear to be more frequent in Argentina and Brazil, where numerous outbreaks have been described in the last decades (Carrillo et al., 1983; Weiblen et al., 1989; Roehe et al., 1997; Rissi et al., 2006).

BoHV-5 is closely related to BoHV-1 and caprine herpesvirus type 1 (CpHV-1) in many biological and molecular aspects (Thiry et al., 2006). Likewise, the pathogenesis and clinical signs of BoHV-1 and CpHV-1 infections in their natural hosts are similar (Engels et al., 1992). Moreover, serological cross-reactivity (Nixon et al., 1988) and nucleotide sequence identity, mainly in the glycoprotein B (gB) gene, have also demonstrated the similarity between these viruses (Ros and Belák, 2002).

Ruminant alphaherpesviruses appear not to be restricted to their natural hosts and may occasionally cross species barriers. Natural infection by BoHV-1 has been detected in a goat with neurological signs and in her herdmates after dexamethasone (Dx) administration (Tolari et al., 1990). In North America, antibodies reacting with BoHV-1 have been detected in goats (Fulton et al., 1982) in free-living mule deer (*Odocoileus hemionus*) in wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) (Aguirre et al., 1995); and in woodland caribou (*Rangifer tarandus caribou*)

(Jordan et al., 2003). Likewise, antibodies to four related herpesviruses (BoHV-1; CpHV-1; cervid herpesvirus type 1 [CvHV-1]; and reindeer herpesvirus) have been detected in wild ruminants in France and Belgium (Thiry et al., 1988). In Brazil, BoHV-1 positive serology has been detected in goats (Castro et al., 1996) and in water buffaloes (Lage et al., 1996). Positive serology to BoHV-5 has also been detected in sheep by using an ELISA able to differentiate BoHV-1 from BoHV-5 antibodies (Lindner et al., 1993).

In addition, BoHV-1 acute and latent infections has been reproduced in sheep (Hage et al., 1997) and goats (Six et al., 2001). Administration of Dx to latently infected sheep resulted in virus shedding and transmission to sentinel calves and sheep (Hage et al., 1997); latently infected goats also shed virus upon reactivation (Six et al., 2001). The susceptibility of sheep to BoHV-5 has also been demonstrated; and some animals may develop neurological disease upon experimental inoculation (Belák et al., 1999; Silva et al., 1999). Moreover, Dx-induced reactivation was followed by virus shedding and transmission to sentinel sheep, which also became latently infected (Silva et al., 1999). The ability of bovine herpesviruses to cross species barriers and infect related species has raised concerns about a possible role of these species as natural reservoirs of these viruses (Thiry et al., 2006).

We report herein that goats are susceptible to acute and latent infection by BoHV-5 following experimental inoculation. Latently infected goats reactivated the infection and shed virus upon Dx administration. These findings may be epidemiologically relevant in areas where BoHV-5 infection is endemic and goats and cattle are raised in close proximity.

2. Materials and methods

2.1 Experimental design

Eighteen young goats were divided into three groups and were inoculated intranasally with a different Brazilian BoHV-5 isolate. Two animals remained as uninfected controls. The acute infection was monitored on a daily basis, regarding to virus shedding, clinical signs and antibody response. Sixty days after virus inoculation, two animals of each group plus one uninfected control were euthanized for tissue collection. The remaining animals were submitted to Dx administration to reactivate the latent infection and monitored thereafter. Forty days later, these animals were euthanized for tissue collection. Neural tissues collected 60 days post-infection (pi) and 40 days post-reactivation (pDx) were submitted to PCR to investigate the presence of latent viral DNA.

2.2 Cell culture and viruses

A bovine cell line named CRIB (Flores and Donis, 1995) was used in all procedures of virus multiplication, quantitation and isolation from nasal swabs and tissues. Cells were maintained in Eagle's minimal essential medium (MEM) containing penicillin (0.25 mg/mL) streptomycin (0.54 mg/mL) and nystatin (2.5 mg/L), supplemented with 10% fetal calf serum. Three Brazilian BoHV-5 strains (SV-507, EVI-88 and SV-609) were used for inoculation. SV-507 is a well characterized Brazilian BoHV-5 strain, whose genome has been entirely sequenced (Delhon et al., 2003); EVI-88 is also a well characterized BoHV-5 strain (Roehle et al., 1997) and SV-609 is a isolate obtained from an outbreak of neurological disease in a beef cattle herd in Southern Brazil.

2.3 Animals, virus inoculation and Dx administration

Eighteen three to four-months-old BoHV-5 seronegative kids were used for virus inoculation; two kids remained as uninfected controls. The animals were randomly allocated into three groups (named G) according to the BoHV-5 strain to be inoculated, as follows:

Group 1 (G1): n=8, SV-507; Group 2 (G2): n=5, SV-609; and Group 3 (G3): n=5, EVI-88. The goats were inoculated with 10 mL of a viral suspension divided in the two nostrils (total titer of $10^{8.3}$ TCID₅₀/mL). At day 60 pi two animals of each group plus one control were euthanized for tissue collection. The remaining goats were submitted to administration of Dx (0.4 mg.kg⁻¹ for five days; Decadronal, Prodome Laboratories, SP, Brazil). At day 40 pDx these animals were euthanized for tissue collection. All procedures of animals 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 8th 1979). The animal experiments were approved by the Institutional Ethics and Animal Welfare Committee (Comitê de Ética e Bem-estar animal – UFSM, approval # 23081.4288/2006-38 of november 3rd 2005).

2.4 Animal monitoring, sample collection and processing

Following virus inoculation and Dx administration the animals were clinically monitored and nasal swabs for virus isolation were collected on a daily basis up to day 21 pi and day 14 pDx, respectively. The swabs were drained, cleared by centrifugation (10,000 x g for 10 min) and the supernatants (0.15 mL) were inoculated onto monolayers of CRIB cells seeded in 24-well plates. Cell cultures were monitored for cytopathic effect (CPE) during three passages of five days each. The infectivity of those swabs giving positive results in virus isolation was subsequently quantitated by limiting dilution. Viral titers were calculated according to Reed and Muench (1938) and expressed as log₁₀TCID₅₀/mL. Serum samples collected at days 0 and 21 pi, and at days 0 and 14 pDx were submitted to virus-neutralization assay (VN) using two-fold dilutions of serum against 100 to 200 TCID₅₀ of the homologous virus. Necropsy was performed in two animals from each group at day 60 pi and in the remaining animals at day 40 pDx. One control was euthanized in each occasion. The brain,

olfactory bulbs and trigeminal ganglia (TG) were aseptically collected for DNA extraction and virus isolation.

The tissues yielding positive results by PCR were submitted to virus isolation to ascertain the absence of infectious virus. For this, 10% w/v tissue homogenates (50-100 mg of TG and/or olfactory bulb in 0.5-1mL of MEM) were inoculated onto CRIB cell monolayers and monitored for CPE during three passages, as described above.

2.5 DNA extraction for PCR

The tissue sections were cleaned up and minced with a sterile razor blade in Petri dishes. Approximately 50 mg of tissue were submitted to DNA extraction using DNAzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The extraction was performed according to the manufacturer's protocol. After extraction, the DNA was solubilized in 8 mM NaOH (0.15 to 0.20 mL) and stored at -20°C until testing. The DNA concentration was measured by UV absorbance at 260 nm.

2.6 Nested PCR

Total DNA extracted from tissues was submitted to nested-PCR to investigate the presence of viral DNA. The PCR reactions were performed using two set of primers corresponding to positions 57,338 and 57,782 (primers 1 and 2) and 57,372 and 57,666 (primers 3 and 4) of the glycoprotein B gene coding region of the BoHV-5 strain SV-507 (Delhon et al., 2003). The external primers (primer 1 and 2) used in the first reaction were: forward: 5'-CCAGTCCAGGCAACCGTCAC-3' and reverse: 5'-CTCGAAAGCCGAGTACCTGCG-3'. The internal primers (primer 3 and 4) used in the 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 295 bp amplicon. The PCR reaction was performed in 25 µL, using 1.5 µL template DNA (corresponding to approximately 1µg of

total DNA), 100 ng of each primer, 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 10% DMSO, 1X reaction buffer, and 2.5 units of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 10 min, following by 40 cycles at 94°C for 1 min for DNA denaturation, 56°C for 40 s for primer annealing and 72°C for 40 s for primer extension, and final extension at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed under UV light after electrophoresis in an ethidium bromide stained 1% agarose gel. Total DNA extracted from the TG of a calf acutely infected with isolate SV-507 was used as positive control in each reaction; DNA extracted from the TG of the two controls was used as negative control. The specificity of the amplicon was confirmed by nucleotide sequencing of the entire product (295 bp) obtained from olfactory bulb of animal # 66. This sequence was aligned with the homologous region of an available BoHV-5 sequence (BoHV-5 strain SV-507 accession number AY261359), using the BLAST program.

3. Results

3.1 Acute infection

Inoculation of young goats with the Brazilian BoHV-5 strains resulted in efficient viral replication in the nasal mucosa and virus shedding in nasal secretions (Table 1). Virus shedding was detected up to day 14 pi in animals of G1 (mean period length: 11 days); up to day 7 pi in group 2 (mean: 6.2 days) and up to day 9 pi in G3 (mean: 7.6 days). Individual viral titers in nasal secretions reached up to 10^{5.97} TCID₅₀/mL, 10^{5.73} TCID₅₀/mL and 10⁵ TCID₅₀/mL in animals of G1, G2 and G3, respectively. Viral titers peaked between days one and two pi, decreased approximately 2.5 logs and remained fairly steady for two to three days. Thereafter, virus shedding decreased dramatically in G2 and G3, and continued for a few additional days in most animals of G1 (Table 1, Fig. 1A).

The body temperature remained unaltered during the course of acute infection. All inoculated animals developed mild signs of respiratory disease, including mild hyperemia of the nasal mucosa, serous to mucous nasal discharge and mild conjunctivitis. These signs lasted from two to eleven days and subsided spontaneously. All inoculated animals seroconverted to the homologous viruses as ascertained by VN tests performed with sera collected at day 21pi (Table 1). No virus shedding, seroconversion or clinical signs were observed in the control animals.

These results showed that goats are susceptible to acute BoHV-5 infection upon experimental inoculation. Virus replication, shedding and seroconversion were observed in all inoculated animals. Moreover, the animals developed transient and mild signs of respiratory disease during acute infection

3.2 Latent infection

Nasal swabs collected prior to and at the day of Dx treatment were submitted to virus isolation to ascertain the absence of active virus replication. No infectious virus was detected in these swabs after three passages in tissue culture. These results showed that no active virus replication was taking place in the animals and thus they were presumably latently infected.

The administration of Dx starting at day 60 pi resulted in virus reactivation and shedding by eight out of 12 animals (66.6%). Virus shedding was detected in 5/6 animals of G1; 2/3 of G2 and 1/3 of G3; and started at day 6 pDx in animals of G1 and at day 7 and 8 pDx for G2 and G3, respectively (Table 2). The period of virus shedding ranged from 1 day (G2) to 9 days (G1). Viral titers in nasal secretions after Dx administration reached $10^{3.97}$ TCID₅₀/mL in G1, $10^{2.81}$ TCID₅₀/mL in G2 and $10^{1.62}$ TCID₅₀/mL in G3. Viral titers peaked between days nine and 11 pDx in the animals of the G1 and G2 (Fig. 1B). Three animals (G1: 70 and 71; G2: 02) presented a four-fold or higher increase in VN titers. One of these animals (G1: 70) did not shed detectable virus in nasal secretions. Mild respiratory signs including

nasal discharge and rhinitis were observed in many animals following Dx treatment, being more prominent among the animals which shed virus in nasal secretions (animals # 64, 65, 69, 71 and 03). No virus shedding or seroconversion were detected in the control animal. Taken together, the results of virus isolation and serology demonstrated that 75% (9/12) of the goats submitted to Dx administration reactivated the latent infection.

In order to investigate the presence of viral DNA in neural tissues of inoculated goats, total DNA extracted from TG and olfactory bulbs collected prior to Dx treatment (day 60 pi) and 40 days later were submitted to nested PCR. The results of nested-PCR performed on these tissues are presented in Fig. 2. Viral DNA was detected in neural tissues (TG and/or olfactory bulb) of all 18 inoculated animals. A 295 bp product was obtained by amplification of DNA extracted from trigeminal ganglia of 16 goats (16/18) and from the olfactory bulb of 17 animals (17/18). Nucleotide sequencing of the PCR product (272 bp) confirmed the specificity of the amplification, as demonstrated by a >95% homology with the nucleotide sequence of the gB gene coding region available on Genbank (BoHV-5 strain SV-507 accession number AY261359). TGs and olfactory bulbs of the controls animals were negative by PCR. Examination of all tissues for infectivity yielded negative results. The presence of viral DNA in the absence of detectable infectious virus fulfilled the classical definition of latent infection.

These results demonstrate that BoHV-5 did establish latent infection in goats following acute infection. The latent infection could be reactivated by Dx treatment in most animals; and even those animals not shedding virus upon reactivation harbored latent viral DNA in neural tissues. Thus, many aspects of the biology of BoHV-5 acute and latent infection – i.e. virus replication, shedding and reactivation - seem to be very similar in goats and cattle.

4. Discussion

The results showed that young goats are susceptible to BoHV-5 infection upon experimental inoculation. The inoculated animals shed significant amount of virus during acute infection and most of them re-excreted virus after Dx administration. The few animals that did not shed virus after reactivation also harbored latent viral DNA in neural tissues. These findings suggest that natural infection of goats with BoHV-5 may occur in endemic areas where cattle and goats are raised together. Although the ability of goats to transmit the virus to other animals – including cattle - was not addressed in the present study, these data demonstrate the ability of goats to harbor the virus in a latent state and shed virus upon reactivation. Thus, goats should not be disregarded as potential reservoirs of the virus in areas where BoHV-5 circulates among cattle, and where goats are raised in close contact.

The infection by BoHV-1 has major sanitary and economic impact for the livestock industry in many countries. As a consequence, the infection has been eradicated from a few European countries and eradication programs are underway in others (Ackermann and Engels, 2006). The ability of the virus to remain latent in their hosts and the inability of current vaccines to prevent latent infections and reduce the circulation of virus are among the major drawbacks for these efforts. Good marker vaccines and companion tests and better tools to characterize field isolates are needed in these programs (Ackermann and Engels, 2006). The cross-reactivity among different ruminant herpesviruses and the ability of BoHV-1 to cross the species barriers and infect related species have also been a matter of concern since these species may serve as virus reservoirs (Six et al., 2001; Thiry et al., 2006). This issue should be carefully addressed as the currently available serological tests are unable to distinguish the serological response to different ruminant herpesviruses (Six et al., 2001; Vogel et al., 2002; Thiry et al., 2006).

Natural infection by BoHV-1 has been demonstrated in sheep, goats and in wild ruminants (Fulton et al., 1982; Thiry et al., 1988; Aguirre et al., 1995; Castro et al., 1996; Jordan et al., 2003; Yesilbag et al., 2003); and specific BoHV-5 antibodies have been detected in sheep (Lindner et al., 1993). Likewise, acute and latent infections followed by virus reactivation and shedding have been demonstrated for BoHV-1 in sheep (Hage et al., 1997) and goats (Tolari et al., 1990; Six et al., 2001); and for BoHV-5 in sheep (Bélak et al., 1999; Silva et al., 1999). Nevertheless, the potential role of these domestic ruminants in maintaining and transmitting the virus to cattle has been controversial (Hage et al., 1997; Six et al., 2001; Ackermann and Engels, 2006; Thiry et al., 2006). Based on experimental data, it has been suggested that sheep and goats should not be considered in eradication programs since they would not readily transmit the virus to cattle (Hage et al., 1997; Ackermann and Engels, 2006). In contrast, it has also been suggested that these species should be considered potential reservoirs and therefore may represent a threat for eradication efforts (Six et al., 2001; Thiry et al., 2006).

The extensive serological cross-reactivity between BoHV-1 and BoHV-5 poses an additional problem in cattle populations where these viruses co-circulate. BoHV-5 infection and disease are highly prevalent in Brazil where numerous outbreaks are reported every year (Rissi et al., 2006). Likewise, serological evidence indicates a wide distribution of BoHV-1 infection among Brazilian herds (Pituco, 1988). In addition, positive serology to BoHV-1 has been detected in captive water buffaloes and among caprine herds (Castro et al., 1996; Lage et al., 1996). As these viruses co-circulate in the country and can not be differentiated by routine serological tests, the real prevalence and distribution of each virus is uncertain. In any case, the biology and epidemiology of these viruses are so similar that both should be considered together for eradication purposes. Brazil owns a large caprine herd (approximately 13 million heads), concentrated mainly in the northeast region. Cattle and goats are raised together in

many herds, sharing pastures, food, water and facilities. Thus, conditions for interspecies transmission of pathogens may occur. In fact, positive serology to bovine herpesviruses in caprine herds indicates that cattle-to-goats transmission of these viruses in nature may occur (Fulton et al., 1982; Castro et al., 1996; Yesilbag et al., 2003). These data prompted us to investigate whether goats would be susceptible to BoHV-5 infection.

In this experiment, all goats excreted significant amounts of virus for up to 14 days during acute infection and re-excreted virus after Dx administration. The length and magnitude of virus shedding were lower to those usually observed in experimentally infected calves (Vogel et al., 2003) and slightly lower than those observed in sheep inoculated with BoHV-5 (Silva et al., 1999). In addition, none of the goats developed neurological signs upon BoHV-5 inoculation. In a previous experiment, one sheep inoculated with a Brazilian isolate developed fatal neurological disease, characterized by typical clinical signs and pathologic involvement of the CNS (Silva et al., 1999). Similar findings were reported by Belák et al. (1999), who reported the development of neurological infection in sheep inoculated with the BoHV-5 isolate N569. These results suggest that goats may be somewhat less susceptible to BoHV-5 infection than cattle and sheep. Nevertheless, experimental studies have shown that BoHV-5 field isolates display distinct levels of neurovirulence both in calves and rabbits (Flores, E.F. personal communication). Thus, it should not be discarded that some BoHV-5 strain or isolate might be neurovirulent for goats upon experimental or natural infection.

In addition to virus shedding and/or seroconversion after Dx treatment, latent infection was further demonstrated by detection of viral DNA in TG and/or olfactory bulb of all animals euthanized prior and after Dx treatment. In a previous experiment, our group showed that experimentally infected sheep also reactivate and transmit BoHV-5 to sentinel animals. Although the capacity of goats to transmit the virus to other animals was not addressed in the present study, these results clearly show that goats are susceptible to BoHV-5 infection and

excrete virus upon reactivation. Whether these findings have epidemiological relevance would be worthwhile to investigate. In any case, our findings add an important piece of information to the biology and epidemiology of ruminant alphaherpesviruses.

Domestic and wild ruminants have been considered potential reservoirs for BoHV-1 and other alphaherpesviruses in nature. Nevertheless, the epidemiological and practical consequences of infections in these species are probably different. Natural infection of wild ruminant species seems not to represent a major threat for BoHV-1 eradication for several reasons: i. BoHV-1 (and other herpesvirus) infections in wild ruminants are fairly infrequent and the prevalence is usually low; ii. Most populations of wild ruminants are fairly sparse in many countries; iii. Close contact between these populations and domestic cattle would probably be a rather rare event. Thus, opportunities for close contact and virus transmission would probably be infrequent and would not favor virus dissemination within the wild population and to cattle. Even though, it would be advisable to investigate the existence of wild reservoirs for BoHV-1 (and BoHV-5) in regions where BoHV-1 has been eradicated or eradication is underway (Thiry et al., 2006).

Natural BoHV-1 infection (and BoHV-5 as well) of domestic ruminants may have more serious implications for eradication efforts, for several reasons: i. Ovine and caprine herds are very large in many countries; ii. The density of animals in many herds is very high, favoring animal-to-animal contact and virus transmission; iii. Intensive commercial and production practices lead to frequent interchange of animals among herds, increasing the risk of introducing positive animals; iv. Intensive management practices frequently result in stressful situations, favoring virus reactivation and transmission. Lastly and perhaps more importantly, v. In many countries goats and sheep are raised in close contact with cattle, sharing pastures, water, food and facilities (Six et al., 2001). Thus, this situation obviously favors contact and may facilitate transmission of the virus across species. In addition to

potential BoHV1 and BoHV-5 infection in ruminants other than cattle, serological cross reactivity among animal herpesviruses raise potential problems for differential diagnosis (Thiry et al., 2006). In this sense, the development of methods capable of differentiating the serologic response to antigenically related herpesviruses would be of great benefit for eradication purposes (Ackermann and Engels, 2006; Thiry et al., 2006).

In summary, our results bring new information on to the biology of BoHV-5 infection and contribute to the discussion of whether or not BoHV-1/BoHV-5 natural infections of non-bovine species are epidemiologically relevant for control/eradication programs. The biological and epidemiological relevance of these findings are uncertain at this point. The susceptibility of goats to acute and latent BoHV-5 infection might be solely of academic and biological relevance. Nevertheless, it may also represent an additional and relevant issue on the efforts to control/eradicate alphaherpesvirus infections from livestock. The question whether goats and sheep infected by bovine herpesviruses would represent a threat for eradication programs may never be satisfactorily answered by short term experimental studies. In our understanding, a definitive and consistent answer may require long-term follow up studies, in which viral transmission between sheep and/or goats to cattle and vice-versa is continuously monitored under natural conditions. Only such studies would provide enough information as to assure whether maintaining potential virus carriers among cattle would not represent a threat for eradication.

Acknowledgements

This work was supported by an MCT, CNPq, and CAPES. E.F. Flores (520758/96-0) and R. Weiblen (520161/97-1) are recipients of CNPq (Brazilian Council for Research) scholarships. D.G. Diel, S.R. Almeida and M.C.S Brum are recipients of student fellowships from CNPq and R. Dezengrini is recipient of student fellowship from CAPES. We thank the

student workers in our lab for helping in animal experiments.

5. References

- Ackermann, M., Engels, M., 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 113, 293-302.
- Aguirre, A.A., Hansen, D.E., Starkey, E.E., McLean, R.G., 1995. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Prev. Vet. Med.* 21, 313-322.
- Bartha, A., Hadju, G., Aldasy, G., Paczolay, G., 1969. Occurrence of encephalitis caused by infectious rinotracheitis virus in cattle in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 19, 145-151.
- 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. Infec. Dis.* 22, 207-220.
- Carrillo, B.J., Pospischil, A., Dahme, E., 1983. Pathology of bovine viral necrozing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.* 30, 161-168.
- Castro, R.S., Silva, F.A.G., Frutuoso, E.M., Nascimento, S.A., 1996. Anticorpos contra pestivírus e herpesvírus no Estado de Pernambuco. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Olinda, PE, Brasil, 21-25 november 1996, p. 252.
- 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.
- Engels, M., Palatini, M., Metzler, A.E., 1992. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and foreign hosts. *Vet. Microbiol.* 33, 69-78.
- Eugster, A.K., Angulo, A.B., Jones, L.P., 1974. Herpesvirus encephalitis in range calves. In: *Proc. 17th Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diag.* 17, 267-290.

- Flores, E.F., Donis, R., 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) due to a block in viral entry. *Virology*. 208, 565-575.
- Fulton, R.W., Drowning, M.M., Hagstad, H.V., 1982. Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine oral diarrhoea, parainfluenza-3, bovine adenovirus-3 and -7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1454-1457.
- 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.
- Johnston, L.A., Simmons, G.C., McGavin, M.D., 1962. A viral meningo-encephalitis in calves. *Aust. Vet. J.* 38, 207-215.
- Jordan, L.T., Rettie, W.J., Tessaro, S.V., 2003. Evidence of herpesvirus infection in woodland caribou in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* 39, 216-220.
- Lage, A.P., Castro, R.S., Melo, M.I., Aguiar P.H., Barreto, J.B.F., Leite, R.C., 1996. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 49, 195-197.
- Lindner, A., Ambrosius, H., Liebermann, H., 1993. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) in sheep sera. *Dtsch. Tierarzt. Wochenschr.* 100, 390-395.
- Moretti, B., Orfei, Z., Mondino, G., Perschino, A., 1964. Infectious bovine rhinotracheitis clinical observations and isolation of virus. *Vet. Italiana.* 15, 676.
- Nixon, P., Edwards, S., White, H., 1988. Serological comparisons of antigenically related herpesvirus in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* 12, 355-362.

- Pituco, E.M., 1988. Ocorrência da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. Tese de Mestrado, FMVZ-USP, São Paulo. 74p.
- Reed, L., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 18, 493-494.
- Rissi, D.R., Oliveira, F.N., Rech, R.R., Pierezan, F., Lemos, R.A.A., Barros, C.S.L., 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.* 26, 123-132.
- Rock, D.L., 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Semin. Virol.* 5, 233-240.
- Roehe, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, L.G., Rosa J.C.A., 1997. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). *Pesq. Vet. Bras.* 17, 41-44.
- Roizman, B., 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123, 425-449.
- Ros, C., Belák, V., 2002. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Vir. Gen.* 24, 99-105.
- Silva, A.M., Weiblen, R., Irigoyen, L.F., Roehe, P.M., Sur, H.J., Osório, F.A., Flores, E.F., 1999. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet. Microbiol.* 66, 89-99.
- Six, A., Banks, M., Engels, M., Bascuñana, C.R., Ackermann, M., 2001. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Arch. Virol.* 146, 1325-1335.
- Studdert, M.J., 1989. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 125, 584.
- Thiry, E., Vercouter, M., Dubuisson, J., Barrat, J., Sepulchre, C., Gerardy, C., Meersschaert, C., Collin, B., Blancou, J., Pastoret, P.P., 1988. Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. *J. Wildl. Dis.* 24, 268-273.

- Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., Thiry, E., 2006. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 37, 169-190.
- Tolari, F., White, H., Nixon, P., 1990. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. *Microbiol.* 13, 67-71.
- Vogel, F.S.F., Flores, E.F., Weiblen, R., Kunrath, C.F., 2002. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciênc. Rural.* 32, 881-883.
- 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.
- Weiblen, R., Barros, C.S.L., Canabarro, T.F., Flores, E.F., 1989. Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* 124, 666-667.
- Yesilbag, K., Bilge-Dagalp, S., Okur-Gumusova, S., Gungor, B., 2003. Studies on herpesvirus infections of goats in Turkey: prevalence of antibodies to bovine herpesvirus 1. *Revue Vét. Méd.* 154, 772-774.

Table 1
Viral shedding in nasal secretions and virus neutralizing antibodies during acute phase in goats experimentally infected with three Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolates (SV-507, SV-609 and EVI-88).

Group	Animal #	Viral shedding															Virus neutralizing titers	
		Day post inoculation (pi)															Day post inoculation (pi)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	0	21
1 (SV-507)	64	+++ ^a	++ ^b	+ ^c	+	+	+	++	+	+	++	+	++	+	+	-	- ^e	16
	65	+++	+	+	++	+	++	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	4
	66	+++	++	+	+	++	+	+	- ^d	+	+	-	+	-	+	-	-	8
	67	+++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	16
	69	+++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	16
	70	+++	++	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+	-	-	-	-	16
	71	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	16
	72	++	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
2 (SV-609)	01	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
	02	+++	+++	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
	03	+	++	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
	04	++	+++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
	09	+++	+++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
3 (EVI-88)	05	++	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
	06	+++	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32
	07	++	++	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	16
	08	+	+++	+	-	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	16
	10	+++	+	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8

^a Positive sample. Viral titers ranging from $10^{4.73}$ to $10^{5.97}$ TCID₅₀/mL.

^b Positive sample. Viral titers ranging from $10^{3.10}$ to $10^{4.50}$ TCID₅₀/mL.

^c Positive sample. Viral titers ranging from $10^{\leq 1.3}$ to $10^{2.97}$ TCID₅₀/mL.

^d Negative sample after inoculation in cell cultures.

^e Animal with neutralizing antibodies titers ≤ 2 .

Table 2

Viral shedding in nasal secretions and virus neutralizing antibodies after dexamethasone administration in goats experimentally infected with three Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolates (SV-507, SV 609 and EVI-88).

Group	Animal #	Viral shedding in nasal secretions										Virus neutralizing antibodies	
		Day after dexamethasone administration (dpDx)										Day after dexamethasone administration (dpDx)	
		0-5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	0	14
1 (SV-507)	64	- ^a	+ ^b	+	+	++ ^c	++	++	++	+	-	16	32
	65	-	+	+	++	++	+	+	+	+	+	16	32
	67	-	+	+	++	++	++	++	+	-	-	4	4
	69	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	8	16
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	32
	71	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	- ^d	32
2 (SV-609)	02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	4	64
	03	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	8	4
	04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	64
3 (EVI-88)	06	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	8	16
	07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
	08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	8

^a Negative sample after inoculation in cell cultures.

^b Positive sample. Viral titers ranging from $10^{\leq 1.3}$ to $10^{2.97}$ TCID₅₀/mL.

^c Positive sample. Viral titers ranging from $10^{3.10}$ to $10^{4.50}$ TCID₅₀/mL.

^d Animal with neutralizing antibodies titers ≤ 2 .

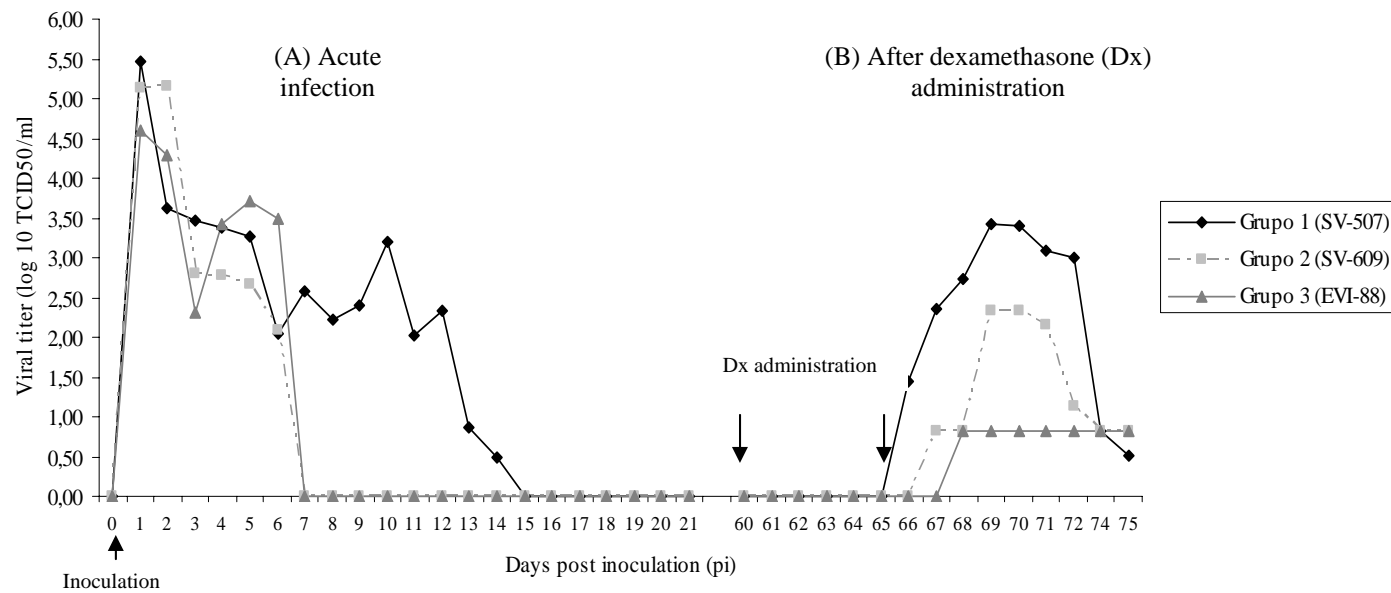


Fig 1. Virus shedding in nasal secretions by goats experimentally infected with three Brazilian isolates of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) during acute infection (A); and after dexamethasone administration (B). The dots represent the mean viral titers for each day, expressed as log₁₀ TCID₅₀/mL. The arrows represent the day of inoculation (0 pi), the first (60 pi) and last (65 pi) day of dexamethasone administration.

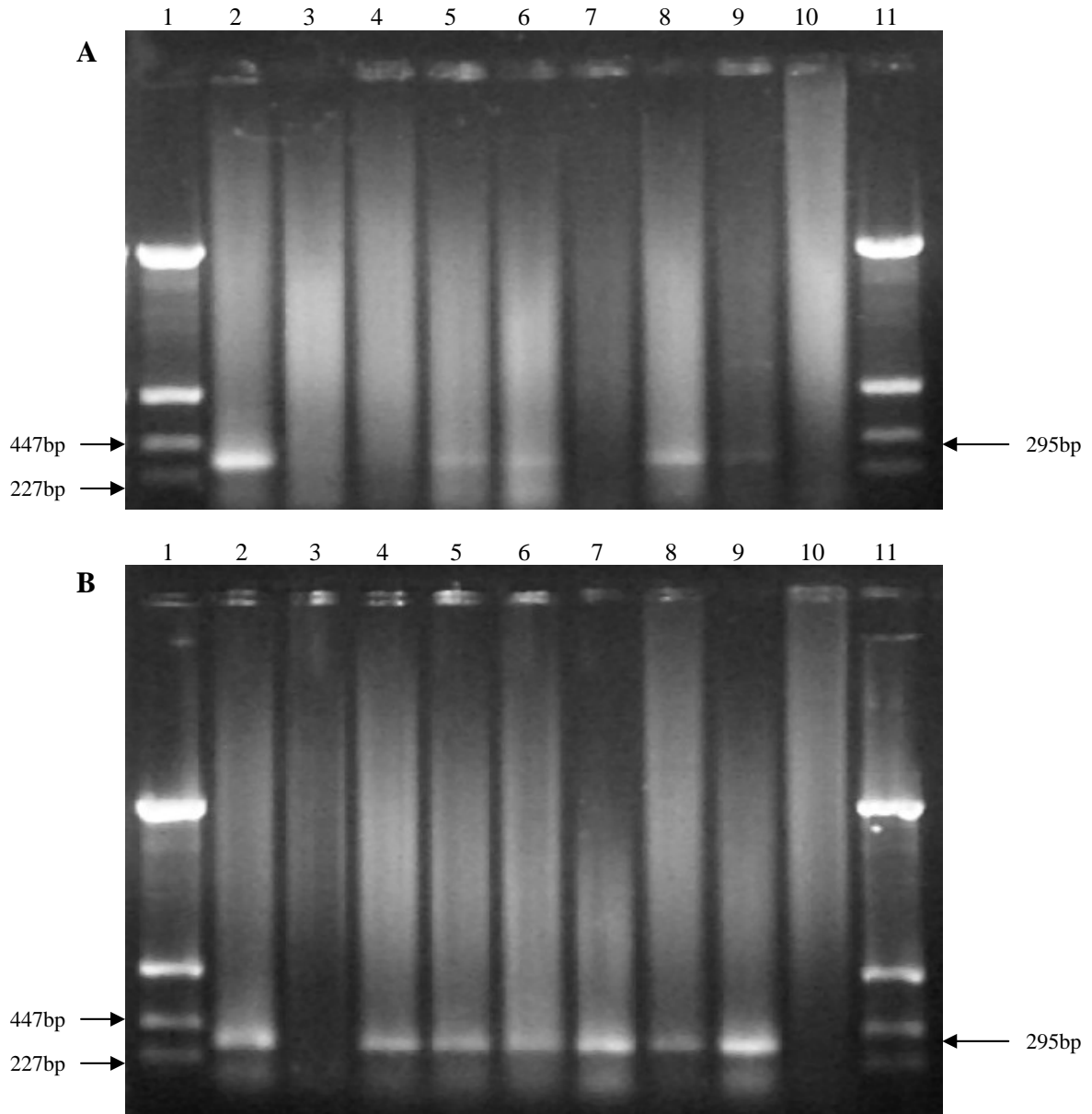


Fig 2. Detection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) DNA in neural tissues of experimentally infected goats. Panel A – tissues collected from animals euthanized at day 60 post inoculation: Lane 1. Molecular weight marker; 2. Positive control; 3. Negative control; 4. Trigeminal ganglia (TG) of animal # 66; 5. Olfactory bulb (OB) of animal # 66; 6. TG of animal # 01; 7. OB of animal # 01; 8. TG of animal # 05; 9. OB of animal # 05; 10. No template; and 11. Molecular weight marker. Panel B – tissues collected from animals euthanized at day 40 post-dexamethasone administration: Lane 1. Molecular weight marker; 2. Positive control; 3. Negative control; 4. TG of animal # 69; 5. OB of animal # 69; 6. TG of animal 02; 7. OB of animal # 02; 8. TG of animal 08; 9. OB of animal 08; 10. No template; and 11. Molecular weight marker. Agarose gel (1%) stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

3. CAPÍTULO 2

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.

Bovine herpesvirus 5 may use the olfactory and trigeminal pathways to invade the central nervous system of rabbits, depending upon the route of inoculation.

Diego Gustavo Diel¹, Érika Toledo da Fonseca¹, Soraia Figueiredo de Souza¹, Alexandre Mazzanti², Fernando Bauermann³, Rudi Weiblen⁴, Eduardo Furtado Flores^{4*}

(Artigo publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 25, n. 3, 2005).

¹Mestrando em Medicina Veterinária (UFSM).

²Depto Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

³Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, UFSM.

⁴Depto 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.-Diel D.G., Fonseca E.T., Souza S.F., Mazzanti A., Bauermann F., Weiblen R. Flores E.F. 2005. [**Bovine herpesvirus 5 may use the olfactory and trigeminal pathways to invade the central nervous system of rabbits, depending upon the route of inoculation.**]

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervosa central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 25(3):164-170. 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

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a major etiological agent of meningoencephalitis in cattle. Following replication in the nasal mucosa, viral invasion of the brain is thought to occur mainly by the olfactory pathway. To address the role of this pathway in the pathogenesis of neurological infection in a laboratory model, thirty days-old rabbits had the main olfactory bulb (MOB) surgically removed and were subsequently inoculated intranasally (IN) or conjunctivally (IC) with a highly neurovirulent BoHV-5 strain (SV-507). Following IN inoculation, 10 out of 10 (100%) control rabbits developed neurological disease. The clinical onset ranged from day 5 to 10 post-inoculation (pi, average 7.5 days); nine being euthanized *in extremis* and one recovering after a mild clinical course. In contrast, only one rabbit (9.1%) of the group lacking the MOB (n=11) developed neurological disease (onset at day 17 pi). Dexamethasone administration to the survivors (n=10) at day 50pi was followed by virus shedding in nasal and/or ocular secretions by 8 animals, demonstrating that the virus was able to reach the trigeminal ganglia (TG) during acute infection. These results demonstrate that the olfactory route provides the main, yet not the sole access to the brain of rabbits following IN inoculation. To address the role of a second pathway, groups of control (n=12) or MOB-lacking rabbits (n=12) were inoculated into the conjunctival sac (IC), following which the virus would be expected to use the ophtalmic branch of the trigeminal

nerve to reach the brain. Ten control rabbits (83.3%) developed neurological disease upon IC inoculation (onset 11 to 20 dpi, average: 15.3 days). Previous ablation of the MOB did not affect the frequency and course of neurological disease: ten out of 12 rabbits (83.3%) lacking the MOB developed neurological disease (onset 9 to 15 dpi, average: 12.7 days) upon IC inoculation. These results demonstrate that both IN and IC routes may operate in the transport of BoHV-5 to the brain of experimentally infected rabbits, depending on the route of inoculation. IN inoculation results in a fast and efficient transport by the olfactory pathway, the trigeminal route providing an alternative, much slower and less efficient transport; IC inoculation results in efficient viral transport by the trigeminal route, yet with a delayed kinetics comparing to the transport provided by the olfactory pathway.

INDEX TERMS: bovine herpesvirus type 5, BHV-5, neurological infection, rabbits.

RESUMO.- O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um importante agente de meningoencefalite em bovinos. Após replicação na mucosa nasal, acredita-se que o vírus invada o cérebro principalmente pela via olfatória. Para investigar a importância dessa via na patogenia da infecção neurológica em um modelo animal, coelhos recém-desmamados (30 dias) foram submetidos à ablação cirúrgica do bulbo olfatório (BO) e posteriormente inoculados pela via intranasal (IN) ou no saco conjuntival (IC) com uma cepa altamente neurovirulenta do BoHV-5 (SV-507). Após inoculação IN, 100% (10/10) dos coelhos controle (com BO) desenvolveram enfermidade neurológica, com início dos sinais clínicos entre os dias 5 e 10 pós-inoculação (pi) (média de 7,5 dias); em contraste, no grupo submetido à ablação do BO (n=11), apenas um animal (9,1%) desenvolveu doença neurológica (início no dia 17 pi). Administração de dexametasona aos animais restantes (n=10) no dia 50 pi resultou em excreção viral em secreções nasais e/ou oculares por oito destes, demonstrando que o vírus foi capaz de atingir o gânglio trigêmeo (TG) durante a infecção aguda. Esses resultados demonstram que a rota olfatória representa a via principal, mas não única, de acesso ao

cérebro de coelhos após inoculação IN. Para investigar o papel de uma segunda possível via de acesso, grupos de coelhos controle (n=12) ou submetidos à ablação do BO (n=12) foram inoculados no saco conjuntival (IC), após o qual o vírus poderia utilizar o ramo oftálmico do nervo trigêmeo para invadir o cérebro. Dez coelhos controle (83,3%) desenvolveram doença neurológica após inoculação IC, com início dos sinais entre os dias 11 e 20 (média 15,3 dias). A ablação prévia do BO não afetou a frequência ou o curso da doença neurológica nesse grupo: 10/12 coelhos (83,3%) sem o BO desenvolveram a doença neurológica, com os sinais iniciando entre os dias 9 e 15 pi (média 12,5 dias). Esses resultados demonstram que tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o cérebro de coelhos inoculados experimentalmente, dependendo da via de inoculação. Inoculação IN resulta em um transporte rápido e eficiente pela via olfatória; com a via trigeminal servindo de acesso mais lento e menos eficiente. Inoculação IC resulta em transporte e invasão eficientes, porém mais tardios, provavelmente pela via trigeminal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: herpesvírus bovino tipo 5, BoHV-5, infecção neurológica, coelhos.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus associado com meningoencefalite em bovinos (Roizman 1992). Infecção natural e experimental de bovinos jovens com o BoHV-5 resulta em invasão e replicação viral no sistema nervoso central (SNC), seguida de enfermidade neurológica de curso geralmente fatal. Os sinais clínicos da enfermidade incluem depressão, tremores, opistótono, protusão da língua, salivação, bruxismo, cegueira, ataxia e convulsões (Bagust & Clark 1972, Carrillo et al. 1983, Beltrão 2000, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002). A infecção e enfermidade neurológica pelo

BoHV-5 têm sido relatadas em vários países, porém com uma frequência maior no Brasil e Argentina (Carrillo et al. 1983, Salvador et al. 1998).

Após a penetração pela via nasal, o BoHV-5 replica na mucosa do trato respiratório superior produzindo sinais respiratórios leves a moderados (Meyer et al. 2001, Vogel et al. 2004). A replicação primária na mucosa nasal pode persistir por mais de 15 dias (Vogel et al. 2004), e frequentemente é seguida de invasão e replicação viral no sistema nervoso central (SNC), resultando em meningoencefalite não supurativa (Bagust & Clark 1972, Narita et al. 1976, Beltrão 2000, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002). Os sinais neurológicos geralmente aparecem a partir do dia 9 ou 10 pós-infecção e incluem tremores, bruxismo, salivação, protusão da língua, opistótono, cegueira, andar em círculos, pressionamento da cabeça contra anteparos, hiperexcitabilidade, decúbito e morte (Bagust & Clark 1972, Narita et al. 1976, Beltrão 2000, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002). Os sinais neurológicos são progressivos e geralmente resultam em morte, embora casos de recuperação após curso clínico de intensidade leve ou moderada também possam ocorrer (Belknap et al. 1994, Beltrão 2000). O vírus e alterações histológicas podem ser detectados em várias áreas do encéfalo de animais que morrem ou são sacrificados durante a enfermidade neurológica (Beltrão 2000, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002).

A exemplo de outros alfa herpesvírus, como o vírus do herpes simplex (HSV, Stroop et al., 1984) e o vírus da pseudorraiva (PRV, Babic et al. 1994, Card et al. 1994), a invasão do encéfalo pelo BoHV-5 a partir dos sítios de replicação primária ocorre através de fibras nervosas cujas terminações distribuem-se na mucosa nasal (Chowdhury et al. 1997, Lee et al. 1999). Nesse sentido, duas vias principais de acesso ao SNC a partir da mucosa nasal têm sido sugeridas: 1. A via olfatória, através das terminações nervosas dos neurônios bipolares que inervam a mucosa olfatória e projetam para o bulbo olfatório e 2. A via trigeminal, pelos axônios dos neurônios pseudounipolares, cujos corpos celulares localizam-se no gânglio

trigêmeo e projetam terminações aos núcleos sensoriais da ponte e do bulbo (Chowdhury et al. 1997, Lee et al. 1999). A cinética de invasão, a distribuição do vírus e as alterações inflamatórias no encéfalo de bovinos em fases precoces da infecção sugerem que o vírus atinge o encéfalo principalmente pela via olfatória (Narita et al. 1976, Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002). Em coelhos utilizados como modelo, o BoHV-5 também parece atingir o SNC mais precocemente e massivamente através da via olfatória (Chowdhury et al. 1997, Lee et al. 1999, Beltrão et al. 2000). Não obstante, a capacidade do BoHV-5 de atingir e estabelecer infecções latentes no gânglio trigêmeo (TG) de coelhos (Caron et al. 2002) e bovinos (Meyer et al. 2001, Vogel et al. 2003), além da detecção freqüente de vírus ou DNA viral no tronco cerebral durante a infecção aguda e latente (Beltrão 2000, Meyer et al. 2001, Vogel et al. 2003), indicam que o transporte através de fibras nervosas que compõem o nervo trigêmeo - i.e. os ramos maxilar e oftálmico - também pode ocorrer, e potencialmente contribuir para a invasão do SNC durante a infecção aguda.

O presente estudo teve como objetivo investigar a importância das vias olfatória e trigeminal no acesso do BoHV-5 ao encéfalo de coelhos após infecção experimental. Para isso, coelhos recém-desmamados foram submetidos à ablação cirúrgica do bulbo olfatório e posteriormente inoculados com uma cepa altamente neurovirulenta do BoHV-5 pela via intranasal ou intraconjuntival. Observou-se que a ablação do bulbo olfatório previamente à inoculação preveniu a infecção e enfermidade neurológica após inoculação intranasal, mas não após inoculação no saco conjuntival. Estes resultados indicam que as duas vias podem operar no acesso do BoHV-5 ao SNC de coelhos, dependendo da via de inoculação e local da replicação primária.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Coelhos recém-desmamados, submetidos ou não à ablação cirúrgica do bulbo olfatório (BO), foram inoculados pela via intranasal (IN) ou conjuntival (IC) com uma cepa de BoHV-5 e posteriormente monitorados quanto à replicação e excreção viral, sinais neurológicos e mortalidade. As taxas de morbidade, mortalidade e o curso clínico da enfermidade neurológica desenvolvida pelos animais dos diferentes grupos foram comparados. Animais que sobreviveram à infecção aguda foram submetidos à administração de dexametasona na tentativa de reativar a infecção latente e assim demonstrar que o vírus foi capaz de atingir o gânglio trigêmeo (TG) durante a infecção aguda.

Células e vírus

Os procedimentos de multiplicação, quantificação e isolamento de vírus de secreções nasais, oculares e tecidos foram realizados em células de linhagem de rim bovino resistentes à infecção por pestivírus (CRIB, Flores & Donis 1995). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6mg/L), estreptomicina (0,4mg/L), suplementado com soro fetal bovino a 5%. Para a inoculação, foram utilizadas alíquotas de 1mL do sobrenadante de cultivos celulares infectados com uma cepa brasileira do BoHV-5 (SV-507; Delhon et al. 2003), contendo $10^{8,3}$ doses infectantes para 50% dos cultivos (DICC₅₀/mL).

Animais, inoculação e monitoramento

Foram utilizados 45 coelhos da raça Nova Zelândia, com idade entre 30 e 40 dias, recém-desmamados, pesando entre 700g e 1,1Kg. Após o desmame (30 dias de idade), os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 a 6 animais cada), alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente alocados em quatro grupos, correspondentes aos tratamentos utilizados: Grupo 1: submetidos à ablação cirúrgica do BO –

inoculação intranasal (n=11); Grupo 2: controle – inoculação intranasal (n=10); Grupo 3: submetido à ablação do BO – inoculação conjuntival (n=12); Grupo 4: controle – inoculação conjuntival (n=12).

Os animais dos grupos 1 e 3 foram submetidos à ablação cirúrgica do BO, de acordo com metodologia descrita detalhadamente por Fonseca et al. (2004). Em resumo, os animais foram anestesiados e submetidos à tricotomia e desinfecção da pele na região entre as órbitas. O acesso à cavidade craniana foi realizado com o auxílio de uma broca cirúrgica de 3 mm de diâmetro. Os bulbos olfatórios foram localizados e aspirados em sua totalidade com o auxílio de uma sonda acoplada a uma bomba de vácuo. Em um experimento preliminar, a técnica foi padronizada e alguns animais foram submetidos à eutanásia logo após a cirurgia, para se assegurar da remoção total dos bulbos olfatórios. Quatro a seis dias após o procedimento, os animais foram inoculados com o BoHV-5, juntamente com os animais dos grupos controle (2 e 4).

Os animais dos grupos 1 e 2 foram inoculados pela via intranasal (IN), através de aberturas dorso-laterais dos seios paranasais (protocolo adaptado por Silva et al. 1999). Para tal, os animais foram previamente anestesiados com 2mg de Tiletamine/Zolazepan (Zoletil, Virbac Lab). A suspensão viral (1mL) foi dividida e inoculada nos seios paranasais de ambos os lados (inóculo total $10^{8,3}$ DICC₅₀). Os animais dos grupos 3 e 4 foram inoculados pela via conjuntival (IC) com a mesma dose de vírus, através de gotejamento da suspensão viral nos sacos conjuntivais de ambos os lados. Para administração de dose e volume equivalentes evitando-se o extravasamento do inóculo, o volume foi dividido e inoculado em três momentos, com intervalos de 1 hora.

Após a inoculação, os animais foram monitorados clinicamente durante 30 dias, com três observações diárias de uma hora. O tempo de aparecimento e as características dos sinais clínicos foram registrados. Suabes nasais ou oculares (dependendo da via de inoculação)

foram coletados a cada três dias até o dia 9pi para pesquisa de vírus. Os suabes foram drenados, centrifugados a 2000 x g por 10 min e o sobrenadante (0,5mL) foi inoculado em monocamadas de células CRIB cultivadas em placas de 24 cavidades e submetido a três passagens de cinco dias cada, monitorando-se o aparecimento de efeito citopático (ECP). Alguns animais que apresentaram manifestações neurológicas foram submetidos à eutanásia 8 a 12 horas após o início dos sinais; outros morreram após o agravamento do quadro clínico. O encéfalo dos animais que morreram ou foram submetidos à eutanásia foi coletado e as diferentes secções do SNC foram processadas para a pesquisa de vírus, conforme descrito anteriormente (Beltrão et al. 2000).

No dia 50pi, os coelhos do grupo 1 (n=10) que sobreviveram à infecção aguda foram submetidos à administração de dexametasona (Azium, Schering Plough) na dose de 2mg/kg durante cinco dias. Nos 12 dias seguintes, secreções nasais e oculares foram coletadas com o auxílio de suabes e submetidas ao isolamento de vírus em células CRIB, conforme descrito acima.

RESULTADOS

O curso virológico e clínico apresentado pelos animais submetidos ou não à ablação prévia do BO e posteriormente inoculados com a cepa SV-507 do BoHV-5 pelas vias intranasal (IN) ou no saco conjuntival (IC) estão resumidos nas Tabelas 1 e 2. No grupo 1 (sem BO, inoculação IN), o vírus foi detectado em secreções nasais até o dia 6pi em todos os 11 animais e no dia 9pi em cinco deles. Apenas um animal desenvolveu sinais neurológicos, no dia 17pi, e foi submetido à eutanásia *in extremis* um dia após. No grupo 2 (controle, inoculação IN) o vírus também foi detectado até o dia 6pi em todos os animais e no dia 9pi em quatro deles. Todos os animais desse grupo apresentaram apatia, depressão e sinais neurológicos como bruxismo, opistótono, andar em círculos e convulsões. Os sinais iniciaram

entre os dias 5 e 10pi (média 7,5 dias) e duraram entre 8 e 72h. Alguns animais apresentaram cegueira (6/10), sialorréia (3/10) e hiperexcitabilidade. Um animal apresentou apatia e bruxismo entre os dias 8 e 10pi e se recuperou. Os demais morreram ou sofreram eutanásia *in extremis* 12 a 24 h após o início dos sinais.

Entre os animais do grupo 3 (sem BO, inoculação IC), a presença do vírus foi detectada no saco conjuntival de 10/12 animais no dia 6pi e em 3/12 no dia 9pi. Dez animais (10/12 ou 83,3%) apresentaram sinais neurológicos característicos. Os sinais clínicos apresentados foram, em geral, muito semelhantes aos apresentados pelos coelhos do grupo 1, porém com início mais tardio (entre os dias 9 e 15pi, média de 12,7 dias). Nos animais do grupo 4 (controle, inoculação IC), replicação viral no saco conjuntival foi detectada até o dia 6pi em 7/12 animais e no dia 9pi em um animal. Dez (10/12) animais (83,3%) apresentaram manifestações neurológicas de curso e características semelhantes ao grupo anterior, com início entre os dias 11 e 20 pi (média 15,3 dias). Dentre todos os animais que desenvolveram sinais neurológicos evidentes, apenas dois (um do grupo 2; outro do grupo 3) recuperaram-se, após um curso de intensidade leve a moderada de dois a três dias; os demais morreram ou foram submetidos à eutanásia. Nestes animais, a presença do vírus foi detectada em diferentes secções do cérebro submetidas ao isolamento em cultivo celular (dados não mostrados).

A administração de dexametasona no dia 50pi aos 10 coelhos do grupo 1 que sobreviveram à infecção aguda foi seguida de excreção viral em oito deles (80,0%). Quatro animais excretaram vírus em secreções nasais e oculares, três excretaram apenas nas secreções nasais e um apenas na conjuntival. A excreção foi detectada já no dia 1pDx em um animal e foi verificada até o dia 11pDx em dois animais. Três animais excretaram vírus apenas durante um dia; três animais excretaram durante dois dias; e nos demais a excreção viral foi detectada em quatro e oito dias, respectivamente.

DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos demonstram que tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o SNC de coelhos após infecção experimental. A rota que contribui para a invasão e replicação maciça que ocorre durante a infecção neurológica aguda depende da via de inoculação, e parece operar com diferentes cinéticas. A inoculação intranasal resulta em transporte rápido com conseqüente invasão e disseminação do vírus no encéfalo, principalmente pela via olfatória. Isso foi demonstrado pela redução drástica na morbidade e mortalidade no grupo de animais sem BO (grupo 1), em comparação com o grupo controle (grupo 2). O desenvolvimento de doença neurológica em um animal deste grupo, no entanto, indica que outra via também pode ser utilizada pelo BoHV-5 para atingir o encéfalo após replicação nasal. Por outro lado, a inoculação IC resulta em transporte viral eficiente ao cérebro, porém com cinética tardia em relação ao transporte pela via olfatória após inoculação IN. A ablação prévia do bulbo olfatório não interferiu com a cinética e curso da enfermidade neurológica nesse grupo, demonstrando que a invasão do SNC ocorreu por outra via, que não a olfatória.

A redução drástica da morbidade e mortalidade após inoculação IN no grupo de coelhos submetidos à ablação do BO (grupo 1) demonstrou que a via olfatória constitui-se na principal rota de acesso ao SNC, confirmando evidências anteriores em bovinos (Narita et al. 1976, Perez et al. 2002) e coelhos (Chowdhury et al. 1997, Beltrão et al. 2000, Perez et al. 2002). A ocorrência de infecção neurológica em um dos animais deste grupo, no entanto, indica que uma via alternativa pode também ser utilizada pelo vírus para atingir o cérebro. Já foi demonstrado que tanto a via trigeminal (ramo maxilar do trigêmeo) como a olfatória podem servir de acesso para o vírus do herpes simplex (HSV) e o vírus da pseudorraiva (PRV) para invadir o SNC em ratos e suínos, respectivamente (McLean et al. 1989, Babic et al. 1994). Estudos realizados por Lee et al. (1999) falharam em demonstrar infecção significativa pelo

BoHV-5 em neurônios do TG de coelhos que sofreram eutanásia até oito dias após inoculação IN. Antígenos virais também não foram detectados nos núcleos da ponte e do bulbo em coelhos examinados nos dias subsequentes. Por isso, os autores sugeriram que a via trigeminal não é importante na invasão do SNC de coelhos após inoculação IN, provavelmente devido a uma incapacidade do vírus de infectar eficientemente as terminações do ramo maxilar do nervo trigêmeo que se distribuem na mucosa respiratória (Lee et al. 1999).

Vários estudos anteriores demonstraram que o TG constitui-se no principal sítio de infecção latente pelo BoHV-5, tanto nos seus hospedeiros naturais (Meyer et al. 2001, Vogel et al. 2003), como em coelhos infectados experimentalmente (Caron et al. 2002). Adicionalmente, pelo menos três evidências no presente estudo fortalecem a hipótese de transporte pela via trigeminal a partir da cavidade nasal: 1. Antígenos do BoHV-5 foram detectados por imunistoquímica no TG de três animais que morreram ou sofreram eutanásia *in extremis* nos dias 11 e 12 pi (dados não mostrados); 2. O curso e cinética da enfermidade neurológica no animal sem BO que desenvolveu doença neurológica após inoculação IN (grupo 1) foram semelhantes aos inoculados pela via IC; a inoculação por esta via provavelmente resulta em transporte via trigeminal; e 3. Administração de dexametasona nos animais sem BO resultou em reativação e excreção viral nas secreções nasais e oculares, demonstrando inequivocamente que o vírus foi capaz de atingir o TG durante a infecção aguda. Esses resultados indicam que o BoHV-5 pode ser transportado também pela via trigeminal. No entanto, essa via provavelmente não seja importante na patogenia da doença neurológica aguda após inoculação IN, por duas razões: 1. A quantidade de vírus que atinge o TG pela via trigeminal após inoculação IN seria insuficiente para assegurar a replicação e posterior invasão do encéfalo a partir daí - mas suficiente apenas para o estabelecimento de infecção latente, como foi demonstrado pela reativação e excreção viral após tratamento com dexametasona. 2. A invasão e replicação viral maciça do SNC que ocorrem pela via olfatória,

e o conseqüente desenvolvimento de doença neurológica e morte, provavelmente precedem a invasão que estaria em curso pela via trigeminal. A diferença no tempo de início dos sinais clínicos nos grupos inoculados pela via IN (média 7,5 dias) versus IC (média 12,7 dias), e o início tardio dos sinais no animal sem BO inoculado pela via IN (17 dias), reforçam esta hipótese e podem explicar a falha em detectar o vírus no TG no dia 8 após inoculação IN (Lee et al. 1999). A probabilidade de se detectar vírus ou antígenos virais no TG após inoculação IN aumentaria nos animais que desenvolvem a doença neurológica mais tardiamente, como observado no presente estudo.

Os resultados da inoculação do BoHV-5 pela via conjuntival, nos animais dos grupos 3 e 4 (com e sem BO), confirmaram que o vírus pode utilizar outra via, que não a olfatória, para invadir o SNC de coelhos. A via de acesso utilizada provavelmente foi o ramo oftálmico do nervo trigêmeo, cujas terminações distribuem-se sob a mucosa conjuntival (Babic et al. 1994, Card et al. 1994, Stroop et al. 1994). O transporte do vírus ao SNC provavelmente envolveu várias etapas: 1. Replicação na mucosa conjuntival e penetração nas terminações nervosas do ramo oftálmico; 2. Transporte retrógrado pelo nervo oftálmico até os corpos neuronais no gânglio trigêmeo; 3. Replicação nos neurônios do TG e/ou transporte anterógrado até os neurônios de segunda ordem nos núcleos pontinos e bulbares; 4. Transporte e disseminação aos neurônios de terceira ordem no cerebelo e tálamo e daí aos neurônios de quarta ordem no córtex cerebral. Esses resultados contrariam estudos anteriores que indicavam que a via trigeminal não é importante para a invasão do SNC, devido ao fato do vírus não ser transportado eficientemente no sentido anterógrado, do TG para os núcleos da ponte e bulbo (Lee et al. 1999). Os resultados do presente experimento sugerem que o vírus provavelmente seja transportado eficientemente no sentido anterógrado, do TG em direção ao SNC. No entanto, após inoculação IN isso não poderia ser demonstrado porque a invasão maciça que ocorre pela via olfatória antecederia a invasão do SNC pela via

trigeminal. Nos animais do grupo 1, é possível que a quantidade de vírus que atingiu o TG tenha sido suficiente para o estabelecimento de infecção latente, porém insuficiente para a invasão do SNC a partir do TG. Nos animais dos grupos 3 e 4, a quantidade de vírus que foi transportada pela via trigeminal até os corpos neuronais situados no gânglio provavelmente foi maior, resultando em replicação e invasão dos núcleos da ponte e do bulbo e daí para as outras regiões do encéfalo. Diferenças de tropismo pelas terminações dos neurônios localizadas no epitélio respiratório e conjuntival, assim como diferenças no transporte retrógrado e anterógrado através dos axônios e/ou dendritos também podem explicar as diferenças na eficiência e/ou cinética de transporte dos alfa herpesvírus em diferentes vias nervosas (Babic et al. 1994, Card et al. 1994, Chowdhury et al. 1997, Lee et al. 1999).

Em resumo, os resultados indicam que tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o cérebro de coelhos após infecção experimental. A replicação nasal resulta em transporte rápido e eficiente pela via olfatória e desenvolvimento precoce de infecção e doença neurológica. O transporte do vírus pela via trigeminal também pode ocorrer, porém parece não contribuir para a patogenia da doença aguda, pois é menos eficiente e mais tardio. A inoculação e replicação viral na mucosa ocular também resultam em transporte e invasão eficientes ao SNC. Essa invasão, porém, é mais tardia do que a que ocorre pela via olfatória após inoculação IN, e provavelmente ocorre pela via trigeminal. Esses resultados fornecem importantes informações sobre a patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5. No entanto, os experimentos foram realizados em um modelo experimental, e como tal necessitam investigações posteriores para se verificar se mecanismos semelhantes ocorrem nos seus hospedeiros naturais.

Agradecimentos: Ao Diretor do Biotério Central da UFSM, Médico Veterinário Silvandro Noal pela cedência e alojamento dos animais durante o experimento. Aos bolsistas de iniciação científica pelo auxílio com a manipulação e monitoramento dos animais. Ao CNPq

pelos recursos e bolsas (E.F.F. [352386/96-7] e R.W. [520011/95]) são bolsistas PQ do CNPq e D.G.D possui bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- Babic N., Mettenleiter T.C., Ugolini G., Flamand A. & Coulon P. 1994. Propagation of pseudorabies virus in the central nervous system of the mouse after intranasal inoculation. *Virology*. 204:616-625.
- Bagust T. J. & Clark L. 1972. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Path.* 82:375-383.
- 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.
- Beltrão N. 2000. Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): infecção experimental de bovinos e utilização de coelhos como modelo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 54p.
- 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.
- Card J. P., Rinaman L., Schwaber J.S., Miselis R.R., Whealy M.E., Robbins A.K. & Enquist L.W. 1994. Neurotropic properties of pseudorabies virus: transneuronal passage in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 10:1974-1994.
- 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.* 284(4):285-295.

- Carrillo B.J., Pospischil A. & Dahme E. 1983. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentr. Vet. Med. B.* 30:161-168.
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Mosier B.J., Sur J-H., Osorio F.A., Kenned G. & Weiss M.L. 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. *J.Comp.Pathol.* 117:295-310.
- Delhon G., Moraes M. P., Lu Z., Flores E.F., Weiblen R., & Rock D. 2003. Genome of bovine herpesvirus type 5. *J.Virol.*, 77:10339-10347.
- 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. *Viol.* 208:565-575.
- Fonseca E.T., Diel D.G., Souza S.F., Gomes K. Mazzanti A., Weiblen R & Flores E.F. 2004. Ablação dos bulbos olfatórios em coelhos. XIX Jornada Acadêmica Integarda – JAI. UFSM, 19-21 outubro.
- Lee B.J., Weiss M.L., Mosier B.J. & Chowdhury S.I. 1999. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J. Neurovirol.* 5:474-484.
- McLean, J.H. Shipley M.T. & Bernstein D.I. 1989. Golgi-like, transneuronal retrograde labeling with CNS injections of herpes simplex virus type 1. *Brain Res. Bull.*, 22:867-881.
- Meyer G., Lemaire M., Ros C., Belak K., Gabriel A., Cassart D., Coignoul F., Belak 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.
- 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.
- Narita M., Inui S., Namba K. & Shimizu Y. 1976. Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Path.* 86:93- 100.
- Roizman B. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123:425-449.

Salvador S.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M., Osorio A.L.A.R. 1998. Meningoencephalitis in cattle caused by bovine herpesvirus-5 in Mato Grosso do Sul and São Paulo. *Pesq.Vet.Bras.* 18:76-83.

Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Canto M.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M. & Sousa R.S. 1999. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Rev. Microbiol.* 30:22-31.

Stroop W.J., Rock D.I. & Fraser N.W.1984. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory system of the mouse central nervous system during acute and latent infection by in situ hybridization. *Lab.Invest.*, 51:27-38.

Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkellmann E.R., Mayer S.V. & Bastos G. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41:4512-4520.

Vogel F.S.F., Lima M., Flores E.F., Weiblen R., Winkellmann E.R., Mayer S.V., Mazzutti K. C., & Arenhart S. 2004. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Ciênc. Rural.* 34:1619-1621.

Tabela 1. Achados virológicos e clínicos em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 submetidos ou não à ablação prévia do bulbo olfatório.

Tratamento		Excreção viral ^a (dpi)			Início dos sinais (dpi)	Curso clínico
		3	6	9		
G1 – Sem BO Inoculação IN	1	+	+	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	17	Bruxismo, opistótono, convulsões
	4	+	+	+	-	-
	5	+	+	+	-	-
	6	+	+	+	-	-
	7	+	+	-	-	-
	8	+	+	-	-	-
	9	+	+	+	-	-
	10	+	+	-	-	-
	11	+	+	-	-	-
G2 - Controle Inoculação IN	12	+	+	ϕ ^b	8	Bruxismo, convulsões, cegueira e andar em círculos
	13	+	+	ϕ	7	Bruxismo, opistótono e convulsões
	14	+	+	ϕ	5	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira e sialorréia
	15	+	+	ϕ	7	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira, miose
	16	+	+	ϕ	7	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira e sialorréia
	17	+	+	-	8	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira, miose
	18	+	+	-	10	Bruxismo e mutilação
	19	+	+	+	10	Bruxismo, opistótono, convulsões, sialorréia
	20	+	ϕ	ϕ	5	Bruxismo, opistótono, cegueira, andar em círculos
	21	+	+	-	8	Bruxismo e apatia (recuperou-se)
G3 – Sem BO Inoculação IC	34	+	+	+	14	Bruxismo, convulsões, miose
	35	+	+	-	11	Bruxismo, opistótono, convulsões e andar em círculos
	36	+	+	-	-	-
	37	+	-	-	14	Bruxismo, opistótono, convulsões e miose
	38	+	+	-	13	Bruxismo, opistótono, convulsões
	39	+	+	+	14	Bruxismo, opistótono, convulsões
	40	+	+	-	13	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira e sialorréia
	41	+	+	+	15	Bruxismo, opistótono (recuperou-se)
	42	+	+	-	12	Bruxismo, opistótono, convulsões
	43	+	+	-	-	-
	44	+	-	-	9	Bruxismo, opistótono, incoordenação e sialorréia
45	+	+	-	12	Bruxismo, opistótono e convulsões	
G4 - Controle Inoculação IC	22	+	-	-	11	Bruxismo, opistótono e sialorréia
	23	+	-	-	-	-
	24	+	+	-	11	Bruxismo, opistótono, excitação, estado de alerta
	25	+	+	-	-	-
	26	+	+	-	17	Bruxismo, opistótono, apatia e incoordenação
	27	+	+	-	14	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira, andar em círculos
	28	+	+	-	20	Bruxismo, opistótono, convulsões e incoordenação
	29	+	+	+	18	Bruxismo e apatia
	30	+	-	-	12	Bruxismo, opistótono, convulsões, cegueira, andar em círculos
	31	+	+	-	13	Bruxismo, opistótono, convulsões e sialorréia
32	+	-	-	19	Bruxismo, opistótono, convulsões e miose	
33	+	-	-	18	Bruxismo, opistótono, convulsões, nistagmo, andar em círculos	

^a Vírus em secreções nasais ou oculares, de acordo com a via de inoculação. ^b Morreram antes da coleta.

Tabela 2. Resumo do curso clínico, morbidade e mortalidade em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5.

Grupo	Tratamento	Número	Morbidade	Início dos sinais dpi (média)	Mortalidade
1	Ablação do BO + inoculação intranasal	11	1 (9,1%)	17	1 (9,1%)
2	Controle + inoculação intranasal	10	10 (100%)	5-10 (7,5)	9 (90%)
3	Ablação do BO + Inoculação conjuntival	12	10 (83,3%)	9-15 (12,7)	9 (75%)
4	Controle + inoculação conjuntival	12	10 (83,3%)	11-20 (15,3)	10 (83,3%)

4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicam que:

CAPÍTULO 1

- Caprinos jovens experimentalmente infectados com o BoHV-5 são susceptíveis à infecção aguda e latente.
- A infecção aguda caracterizou-se por sinais respiratórios brandos, excreção viral em secreções nasais e soroconversão.
- A espécie caprina é capaz de albergar o BoHV-5 no estado latente e a administração de dexametasona resulta em reativação da infecção latente e excreção de vírus nas secreções nasais.

CAPÍTULO 2

- Tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o SNC de coelhos após infecção experimental.
- A via olfatória se constitui na principal rota de acesso ao SNC, pois o transporte por esta via é mais rápido e resulta no desenvolvimento precoce de infecção e doença neurológica.
- O transporte do vírus pela via trigeminal também ocorre, porém parece não contribuir para a patogenia da doença aguda, pois é mais tardio e o transporte pela via olfatória precede o transporte pela via trigeminal.

5. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3/4, p. 293-302, mar. 2006.

AGUIRRE, A.A. et al. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 21, n. 4, p. 313-322, 1995.

BABIC, N. et al. Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v. 204, n. 2, p. 616-625, 1994.

BAGUST, T.J.; CLARK L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, n. 4, p. 375-383, 1972.

BARENFUS, M. et al. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 143, n. 1, p. 725-728, 1963.

BARTHA, A. et al. Occurrence of encephalitis caused by infectious rhinotracheitis virus in cattle in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 19, n. 2, p. 145-151, 1969.

BELÁK, K. et al. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 207-220, 1999.

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

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.

BULACH, D.M.; STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 113, n. 1/2, p. 17-34, 1990.

CARD, J.P. et al. Neurotropic properties of pseudorabies virus: uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 1974-1994, 1990.

CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine viral necrozing encephalitis in Argentina. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B**, v. 30, n. 3, p. 161-168, 1983.

CASTRO, R.S. et al. Anticorpos contra pestivírus e herpesvírus no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, 1996, Olinda. **Anais...** Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1996. p. 252.

CHOWDHURY, S.I. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in rabbits seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 4, p. 295-310.

COLODEL, E.M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.

d'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitis bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 534-539, 1993.

d'OFFAY, J.M. et al. Diagnosis of encephalitis bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 2, p. 247-251, 1995.

ELIAS, F.; SHILD, A.L; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2004.

ENGELS, M.; PALATINI, M.; METZLER, A.E. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and foreign hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 33, n. 1/4, p. 69-78, 1992.

EUGSTER, A.K.; ANGULO, A.B.; JONES, L.P. Herpesvirus encephalitis in range calves. Proceedings Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnostic., v. 17, p. 267-290, 1974.

FULTON, R.W.; DROWNING, M.M.; HAGSTAD, H.V. Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea, parainfluenza-3, bovine adenovirus-3 and -7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 8, p. 1454-1457, 1982.

HAGE, J.J. et al. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus-1 transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n.1, p. 41-54, 1997.

JOHNSTON, L.A.; SIMMONS, G.C.; MCGAVIN, M.D. A viral meningo-encephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 207-215, 1962.

JORDAN, L.T.; RETTIE, W.J.; TESSARO, S.V. Evidence of herpesvirus infection in woodland caribou in Saskatchewan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 216-220, 2003.

KRITAS, S.K.; PENSAERT, M.B.; METTENLEITER, T.C. Invasion and spread of single glycoprotein deleted mutants of Aujeszky's disease virus (ADV) in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 3/4, p. 323-334, 1994.

LAFAY, F. et al. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant Av01 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 320-330, 1991.

LAGE, A.P. et al. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 49, n. 3, p. 195-197, 1996.

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

LINDNER, A.; AMBROSIUS, H.; LIEBERMANN, H. The development of an ELISA for detection of antibodies against type-5 bovine herpesvirus (BHV-5) in sheep sera. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 100, n. 10, p. 390-395, 1993.

RIET-CORRÊA, F. et al. Meningoencefalite e necrose de córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, n. 1/2, p. 13-16, 1989.

RIET-CORRÊA, G. et al. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causada pelo herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 44-46, 2006.

RISSI, D.R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 26, n. 2, p. 123-132, 2006.

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

ROEHE, P.M. et al. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: an update. ***Archives of Virology***, v. 123, n. 3/4, p. 425-449, 1992.

ROIZMAN, B.; PELLET, P.E. The family herpesviridae: A brief introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. ***Fields Virology***. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. cap. 71, p. 2381-2461.

SALVADOR, S.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino tipo-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 18, n. 2, p. 75-82, 1998.

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

SIX, A. et al. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. ***Archives of Virology***, v. 146, n. 7, p. 1325-1335, 2001.

SPENCER, S.E. et al. CNS projections to the pterygopalatine parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. ***Brain Research***, v. 534, n. 1/2, p. 149-169, 1990.

STROOP, W.G.; ROCK, D.L.; FRASER, N.W. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory system of the mouse central nervous system during acute and latent infection by in situ hybridization. ***Laboratory Investigation***, v. 51, n. 1, p. 27-38, 1984.

SWITZER, R.C.; OLMOS de, J.; HEIMER, L. Olfactory system. In: PAXINOS, G. **The rat nerve system**. v. 1. Sydney: Academic Press, 1985. p. 1-36.

THIRY, E. et al. Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. **Journal of Wildlife Disease**, v. 24, n. 2, p. 268-273, 1988.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 169-190, 2006.

TOLARI, F.; WHITE, H.; NIXON, P. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. **Microbiologica**, v. 13, n. 1, p. 67-71, 1990.

TRACEY, D.J. Somatosensory system. In: PAXINOS, G. **The rat nerve system**. v. 2. Sydney: Academic Press, 1985. p. 129-152.

UGOLINI, G.; KUYPERS, H.G.J.M.; SIMMONS, A. Retrograde transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV 1) from motoneurons. **Brain Research**, v. 422, n. 2, p. 242-256, 1987.

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

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

YESILBAG, K. et al. Studies on herpesvirus infections of goats in Turkey : prevalence of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 154, n. 12, p. 772-774, 2003.