

Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos¹

Fernando R. Spilki², Paulo A. Esteves², Ana Cláudia Franco^{2,4}, M. Lima^{2,5}, Carine L. Holz², Helena Beatriz R. Batista^{2,4}, David Driemeier⁴, Eduardo Furtado Flores⁵, Rudi Weiblen⁵ e Paulo M. Roehé^{2,3*}

ABSTRACT.- Spilki F.R., Esteves P.A., Franco A.C., Lima M., Holz C.L., Batista H.B.C.R., Driemeier D., Flores E.F., Weiblen R. & Roehé P.M. 2002. [Neurovirulence and neuroinvasiveness of bovine herpesvirus type 1 and 5 in rabbits.] Neurovirulência e neuroinvasividade de Herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 22(2): 58-63. Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, Cx. Postal 47, Eldorado do Sul, RS 92990-000, Brazil. E-mail: proehe@orion.ufrgs.br

In order to determine the capacity of bovine herpesvirus type 1 and 5 (BHV-1 and BHV-5) to invade, multiply and spread along the central nervous system (CNS) (neuroinvasiveness), as well as their potential to induce neurological illness (neurovirulence), 30 to 35 days old rabbits were inoculated with the BHV-5 strain EVI 88 / 95 and Los Angeles and Cooper BHV-1 strains, by the intrathecal (IT) and intranasal (IN) routes. The BHV-5 strain induced severe neurological clinical signs in 100% (12/12) of the rabbits inoculated by both routes. Histopathological examination revealed multifocal non-suppurative meningoencephalitis, characterized by multifocal gliosis and perivascular cuffing. Virus was recovered from many parts of the brain. Both BHV-1 strains, when inoculated via IT route, were not neurovirulent. The strain Los Angeles, after IN inoculation, induced signs of severe respiratory disease (7/7), as well as signs of neurological impairment, indistinguishable from those induced by BHV-5, in 57% (4/7) of the infected rabbits. However, the rabbits with nervous signs revealed at histopathology vasculitis and thrombosis in lungs and brain, the latter with foci of neuronal necrosis, but no lesions indicative of encephalitis, suggesting that neural damage was probably consequent to tissue anoxia. The BHV-1 strain Cooper, after IN inoculation, induced only mild signs of respiratory disease. These findings indicate that the BHV-5 strain was both neuroinvasive and neurovirulent, since it was capable of invading, spreading and multiplying in the rabbits' brains by both routes of inoculation, yet causing neurological disease, apparently consequent to virus induced neural damage. The BHV-1 Los Angeles strain was not neuroinvasive, whereas its neurovirulence was probably consequent to tissue anoxia, which histologically seemed not to be related to direct viral pathogenic effect. The BHV-1 strain Cooper was neither neurovirulent nor neuroinvasive for rabbits. It is possible that these observations bear relationship with the frequent association of BHV-5 with encephalitis in cattle, as opposed to BHV-1 encephalitis, which is a rare event in nature.

INDEX TERMS: Infectious bovine rhinotracheitis, IBR, BHV-1, bovine encephalitis herpesvirus, BHV-5.

¹Aceito para publicação em 11 de abril de 2002.

²Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CPVDF/FEPAGRO), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS 92990-000 Brazil.

³Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia, UFRGS, Porto Alegre, RS 90050-170. *Autor para correspondência: Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS 90001-970 Brazil, E-mail: proehe@orion.ufrgs.br

⁴Faculdade de Veterinária, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS.

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS.

RESUMO.- Com o objetivo de avaliar a capacidade dos herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5) de invadir e replicar no sistema nervoso central (SNC) (neuroinvasividade), bem como sua capacidade de induzir doença neurológica (neurovirulência), coelhos com 30 a 35 dias de idade foram inoculados com uma amostra do Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5; amostra EVI 88/95) ou com amostras de BHV-1 (Los Angeles ou Cooper), pelas vias intratecal (IT) e intranasal

(IN). A inoculação da amostra de BHV-5, tanto pela via IT como IN, induziu sinais clínicos neurológicos em 100% (12/12) dos coelhos inoculados. Os exames histopatológicos revelaram um quadro de meningoencefalite não-purulenta multifocal, caracterizada por gliose multifocal e infiltrados perivasculares. O vírus foi isolado de várias áreas do SNC desses animais. As amostras de BHV-1, quando inoculadas pela via IT, não foram neurovirulentas. A amostra Los Angeles de BHV-1, quando administrada pela via IN, induziu sinais respiratórios severos, além de sinais neurológicos em 57% (4/7) dos animais inoculados. Entretanto, o exame histopatológico destes quatro animais revelou vasculite e trombose no pulmão e cérebro, este último apresentando focos de necrose neuronal, porém sem lesões indicativas de encefalite. Isso sugere que os sinais neurológicos foram, provavelmente, conseqüentes a prejuízos no fluxo sanguíneo encefálico, e não a danos neuronais provocados pela inoculação desse vírus. A amostra Cooper de BHV-1, quando inoculada pela via IN, induziu apenas sinais leves de infecção respiratória. Estes resultados indicam que apenas a amostra de BHV-5 foi capaz de invadir e replicar no encéfalo dos coelhos quando inoculada tanto por via IN como IT, apresentando neuroinvasividade e neurovirulência. É possível que estas observações tenham relação com o fato de amostras de BHV-5 freqüentemente causarem encefalites, em contraposição a infecções pelo BHV-1, onde encefalites são raramente observadas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR, BHV-1, herpesvírus da encefalite bovina, BHV-5.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), um alfa herpesvírus da família Herpesviridae, causa tipicamente meningoencefalites não-purulentas em bovinos jovens (French 1962, Gardiner & Nairn, 1964, Hall et al. 1966, Carrillo et al. 1983, Bratanich et al. 1991, Salvador et al., 1998, Cascio et al. 1999, Murphy et al. 1999,) sendo estreitamente relacionado antigenicamente e geneticamente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). BHV-1, por sua vez, causa infecções respiratórias e genitais em bovinos, estando raramente associado a quadros de encefalite (Metzler et al. 1996, Pringle 2000, Roels et al. 2000).

Coelhos têm sido freqüentemente utilizados como modelos experimentais para infecções por herpesvírus (Rock et al. 1992, Meyer et al. 1996, Chowdhury et al. 1997, Beltrão 2000). Nestes estudos, as vias mais freqüentemente utilizadas para inoculação tem sido a intranasal (IN) (Silva et al. 1995, Meyer et al. 1996, Beltrão 2000, Chowdhury et al. 2000a) ou ocular (Beltrão 2000). Por via IN, diferentes amostras de BHV-5 provocam meningoencefalites fatais em coelhos com diferentes graus de patogenicidade (Beltrão 2000). Por outro lado, as amostras de BHV-1 até o presente inoculadas neste modelo não tem induzido sinais ou lesões indicativas de comprometimento neurológico (Rock et al. 1986, Rock et al. 1992, Brown & Field 1990). Em bovinos, no entanto, observam-se a campo, embora com pouca freqüência, encefalites induzidas pelo BHV-1, onde os achados clínicos e patológicos lembram aqueles associados ao BHV-5 (Storts 1998,

Pringle 2000, Roels et al. 2000). Assim, permanecem ainda desconhecidos os mecanismos que levam a essa aparentemente esporádica tendência a induzir encefalites.

Buscando esclarecer alguns aspectos desse fenômeno, no presente estudo buscou-se analisar de forma independente duas variáveis da infecção em coelhos, quais sejam, a neuroinvasividade, definida como a capacidade do vírus de invadir, multiplicar-se e distribuir-se no sistema nervoso central (SNC), e a neurovirulência, definida como a capacidade do vírus de provocar lesões no SNC. Para tanto, uma amostra de BHV-5 e duas amostras de BHV-1, cada uma delas com características diferentes em relação ao seu neurotropismo (Engels et al. 1986), foram inoculadas em coelhos pelas vias intratecal (IT) e intranasal (IN). A via IT foi utilizada como indicador de neurovirulência, visando examinar se haveria replicação viral no SNC; a via IN serviu como indicador de neuroinvasividade, através da análise da capacidade das diferentes amostras de vírus de invadir o SNC após replicação primária na mucosa respiratória.

MATERIAL E MÉTODOS

Células

Os procedimentos de multiplicação, quantificação viral, isolamento de vírus de tecidos e soroneutralização foram feitos utilizando células da linhagem MDBK (Madin Darby bovine kidney), livres de contaminação pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo enrofloxacina 5% (0,2 mL/L), acrescido de 6% de soro fetal bovino (Nutricell).

Vírus e inoculação dos animais

A amostra de BHV-5 "EVI 88/95" foi isolada de um caso de meningoencefalite (Roehe et al. 1997). Esta amostra é considerada uma representante típica da maioria das amostras de BHV-5 isoladas no Brasil (Almeida et al. 1998) e demonstrou ser altamente neuropatogênica para coelhos em estudos anteriores (Silva et al. 1999, Beltrão 2000). A amostra Los Angeles (LA) de BHV-1.1, usada freqüentemente como padrão, foi isolada de um surto de rinotraqueíte infecciosa bovina (Madin et al. 1956). Esta amostra foi incluída nesse estudo devido a características genômicas diferenciadas, que foram associadas a prováveis diferenças em seu neurotropismo (Engels et al. 1986). A amostra Cooper foi igualmente incluída por ser considerada, antigênica e genomicamente, uma amostra típica de BHV-1.1 (Gibbs & Rweyemamu 1977). Todos os vírus foram multiplicados seguindo procedimentos de rotina (Roehe et al. 1997).

Animais e inoculação

Foram utilizados quarenta coelhos com idade entre 30 e 35 dias, pesando em torno de 400g, soronegativos para o BHV-1 e BHV-5. Seis coelhos foram mantidos como controle, um para cada grupo, com mesma idade e peso. Os grupos foram alojados em gaiolas coletivas e receberam ração, pasto verde e água *ad libitum*. Previamente às inoculações, os animais foram submetidos à anestesia com 0,2 ml/kg de uma combinação de zolazepam e tiletamina (Zoletil, Virbac) administrados por via intramuscular.

Inoculação intratecal

Após anestesia, os animais dos grupos A, B e C (Quadro 1) foram colocados em decúbito lateral. A região nucal foi tricotomizada,

esterilizada com álcool iodado e o queixo foi aproximado do peito em posição de emprostótono, facilitando o acesso ao espaço subaracnóideo (Laskin & Griffin 1987). Neste ponto, foi inserida uma agulha de calibre 22G, a qual foi então acoplada a uma seringa com 300ml da suspensão viral previamente aquecida a 37°C (os dados referentes aos títulos virais inoculados em cada caso encontram-se detalhados no Quadro 1). A suspensão viral foi injetada lentamente, enquanto eram monitoradas as frequências cardíaca e respiratória do animal. Os controles foram inoculados da mesma forma, utilizando apenas MEM estéril.

Inoculação intranasal

Após a anestesia, os animais dos grupos D, E e F (Quadro 1) foram colocados em decúbito lateral e foi então inserida uma agulha de insulina atingindo as narinas através das cavidades trefinas, sendo inoculados 500µl da suspensão viral correspondente em cada narina (Meyer et al. 1996). Os controles desses grupos foram inoculados da mesma forma, substituindo-se a suspensão viral por MEM estéril.

Monitoramento clínico e patológico

O acompanhamento clínico foi efetuado diariamente por um período de 14 dias após a inoculação (p.i.) ou até a morte dos animais. O monitoramento foi feito através da medição da temperatura retal (TR) e exame em busca de sinais de comprometimento respiratório ou neurológico. Animais que vieram a óbito ou que permaneceram vivos até o dia 14 p.i. foram sacrificados e submetidos à necropsia, sendo coletados encéfalo, traquéia e pulmões para exames histopatológicos e isolamento viral.

Exames histopatológicos

O cérebro, traquéia e pulmões foram coletados durante a necropsia e fixados em formalina tamponada a 10%, processados e corados com hematoxilina e eosina (HE) seguindo procedimentos rotineiros.

Isolamento viral

Fragmentos de encéfalo (bulbo olfatório, cérebro anterior, cérebro posterior, diencéfalo, cerebelo e ponte), bem como pulmões, foram submetidos à pesquisa de vírus. Suspensões a 10% de cada tecido foram preparadas em MEM e clarificadas por centrifugação a 1500xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e inoculado em cultivos celulares, em placas de 96 orifícios. As células inoculadas foram monitoradas diariamente em busca de efeito citopático (ECP). Após um período de 96h foram fixadas e submetidas ao teste de imunoperoxidase (IPX) utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-BHV-5 e anti-BHV-1 (Souza et al. 2001). Os sobrenadantes dos orifícios contendo vírus foram coletados e titulados em placa de microtécnica.

RESULTADOS

Coelhos inoculados com a amostra EVI 88/95 (BHV-5). Sinais clínicos de comprometimento nervoso foram observados em todos os animais dos grupos A (EVI 88/95; inoculação IT) e D (EVI 88/95; inoculação IN; Quadro 1). Os sinais observados foram apatia, incoordenação motora, andar em círculos, arqueamento dorsal da coluna vertebral, convulsões do tipo Jackson (tremores incoordenados unilaterais, irradiando da face aos membros), cegueira transitória, pedalagem, coma e morte. Os exames histopatológicos revelaram meningoencefalite não supurativa multifocal com infiltrados

de linfócitos plasmócitos e macrófagos perivasculares nos vasos das camadas cortical e subcortical dos lobos frontal, temporal e piriforme (Fig. 1). Ocorreram diferenças entre os grupos A e D, sendo o período entre o início dos sinais clínicos maior no grupo inoculado pela via intranasal, bem como os títulos de vírus detectados no SNC foram maiores nos animais inoculados por esta via (Quadro 1).

Coelhos inoculados com a Amostra LA de BHV-1. Nos animais inoculados com a amostra LA de BHV-1 pela via IN (Grupo E) foram observados sinais de infecção respiratória severa a partir do 4º dia p.i. (pós-inoculação), caracterizados por tosse, espirros, secreção nasal mucosa e sibilos pulmonares à auscultação. Quatro dos sete animais evoluíram para um quadro de depressão e incoordenação motora, seguida de coma e morte ao entre os dias 5 e 14 p.i.. À necropsia foi evidenciada grave pneumonia e congestão dos vasos leptomenigeais. O exame histopatológico revelou presença de trombose e vasculite no cérebro e pulmões e áreas focais com necrose de neurônios corticais. O vírus foi isolado em diferentes títulos do SNC e trato respiratório destes animais (Quadro 1).

Os animais do grupo B (LA, via IT), por sua vez, não apresentaram qualquer tipo de manifestação clínica ao longo do experimento.

Coelhos inoculados com a Amostra Cooper de BHV-1. Os animais inoculados com amostra Cooper pela via intranasal (Grupo F) demonstraram sinais leves de doença respiratória entre os dias 7 e 10 p.i., sendo isolado vírus apenas do trato respiratório destes animais (Quadro 1). Os animais do Grupo C, inoculados com a amostra Cooper pela via intratecal, não demonstraram quaisquer alterações clínicas visíveis no decorrer do experimento.

Isolamento de Vírus. Os dados referentes à detecção de vírus estão resumidos no Quadro 1. BHV-5 foi isolado consistentemente do bulbo olfatório, córtex anterior, córtex posterior, diencéfalo e mesencéfalo em ambas as vias de inoculação da amostra EVI 88/95. Esta amostra de BHV-5 foi isolada em

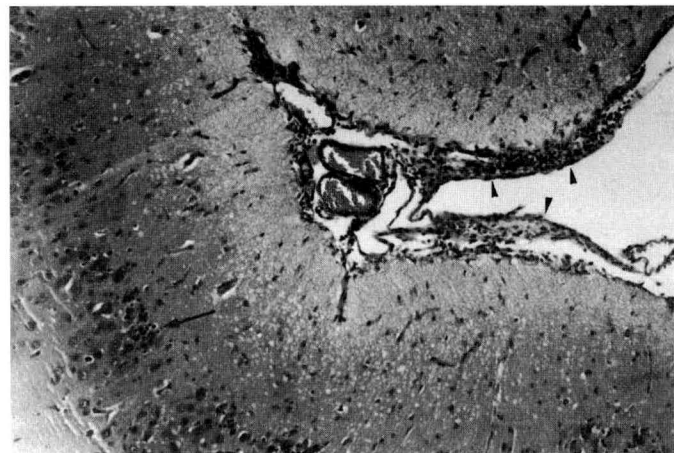


Fig. 1. Meningite mononuclear (pontas de seta), necrose e neurofagia (seta) de neurônios no córtex cerebral de coelho inoculado com a amostra EVI 88/95 de BHV-5 pela via intranasal (IN). HE, obj. 10.

Quadro 1. Sumário dos resultados dos experimentos de inoculação de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) em coelhos

Grupos	Número de animais	Amostra	Via utilizada	Dose (DICC ₅₀ /100ml)	Órgão						Morte	Sinais clínicos
					Pulmão	Bulbo olfatório	Córtex anterior	Córtex posterior	Diencéfalo	Cerebelo/Ponte		
A	4	EVI 88 / 95	Intratecal	3 X 10 ^{7,5}	+ ^a	++	+++	++	+++	+++	4/4 (100%)	Sinais clínicos severos de comprometimento nervoso. Três dos quatro animais morreram e um foi sacrificados <i>in extremis</i>
B	4	LA	Intratecal	3 X 10 ^{8,0}	-	-	-	-	-	-	0/4 (0%)	Ausentes
C	4	Cooper	Intratecal	3 X 10 ^{7,25}	-	-	-	-	-	-	0/4 (0%)	Ausentes
D	8	EVI 88 / 95	Intranasal	10 X 10 ^{7,5}	++	++	++++	++++	++	+	8/8 (100%)	Sinais clínicos severos de comprometimento nervoso. Todos os animais morreram durante o experimento
E	7	LA	Intranasal	10 X 10 ^{8,0}	+++	+	++	+	+	-	4/7 (57%)	Sinais respiratórios em todos os animais. Inco-ordenação motora, convulsões, depressão e morte em quatro dos sete animais
F	7	Cooper	Intranasal	10 X 10 ^{7,25}	++	-	-	-	-	-	0/7 (0%)	Sinais respiratórios brandos em todos os animais

^a+ = representa títulos virais entre 10⁵ e 10¹ DICC₅₀; ++ = representa títulos virais entre 10¹ e 10^{1,5} DICC₅₀; +++ = representa títulos virais entre 10^{1,5} e 10² DICC₅₀; ++++ = representa títulos virais superiores a 10² DICC₅₀.

títulos até 100 vezes maiores no córtex cerebral dos animais inoculados pela via intranasal. As amostras de BHV-1 não foram recuperadas nos tecidos dos animais inoculados pela via intratecal. No entanto, foram isoladas no trato respiratório dos animais inoculados pela via IN em ambas as amostras. BHV-1 só foi encontrado no encéfalo dos animais inoculados pela via IN com a amostra LA. Não foi isolado vírus de nenhum dos controles do experimento.

DISCUSSÃO

Os achados clínicos, virológicos e histopatológicos obtidos indicam que a amostra EVI 88/95 de BHV-5 foi capaz de invadir, replicar e distribuir-se em várias regiões do SNC dos coelhos, por via IT ou por via IN. A mesma foi isolada consistentemente do bulbo olfatório, córtex anterior, córtex posterior, diencéfalo e mesencéfalo, após inoculação por ambas as vias. Esses achados demonstram a neuroinvasividade, bem como a neurovirulência apresentadas por essa amostra.

No córtex cerebral anterior e posterior, os títulos de vírus foram maiores quando utilizada a via IN. Este fenômeno pode estar condicionado à replicação primária do vírus na mucosa respiratória quando inoculado por esta via (Meyer et al. 1996). Estas diferenças poderiam ser devidas a características desta amostra de BHV-5 em particular, concentrando-se maior quantidade de vírus no córtex do que outros isolados de BHV-5. Tais diferenças deverão ser examinadas em estudos futuros, uma vez que os dados aqui obtidos, aliados aos obtidos por outros pesquisadores, sugerem uma grande variação no grau

de patogenicidade de diferentes amostras de BHV-5 (Beltrão 2000). As diferenças em virulência poderiam ser devidas à extensão dos danos causados em zonas específicas do encéfalo. Assim, amostras mais patogênicas provocariam lesões em maior escala em áreas de funções mais importantes na função cerebral. A amostra EVI 88/ 95 de BHV-5 manteve distribuição semelhante à demonstrada por outras amostras nas porções corticais do encéfalo e diencéfalo, após inoculado por via IT ou IN (Meyer et al. 1996, Chowdhury et al. 1997, Lee et al. 1999). No entanto, o BHV-5 vírus foi isolado em maiores títulos no cerebelo e medula dos animais infectados pela via IT. Essa observação pode ser um artefato consequente à proximidade dessa área à via de inoculação.

Estudos recentes têm imputado as diferenças em neuropatogenicidade de amostras de BHV-5 e BHV-1 a domínios em proteínas específicas do envelope, tais como as glicoproteínas E (gE, Chowdhury et al. 2000a), I (gI, Chowdhury et al. 2000a), C (gC, Chowdhury et al. 2000b, Liman et al. 2000) e H (gH, Meyer et al. 1999). No entanto, recentemente, análise do genoma de uma amostra de BHV-5 revelou diferenças importantes em relação ao BHV-1 em outras regiões do genoma (Moraes et al. 2001). Portanto, é provável que a neuropatogenicidade seja produto da interação de vários produtos gênicos, muitos dos quais ainda não analisados (Flores et al. 1998).

A amostra LA de BHV-1, quando inoculada pela via IN, foi capaz de induzir doença respiratória associada a sinais clínicos de comprometimento nervoso. Foi possível o isolamento

do vírus tanto do trato pulmonar quanto do cérebro. No entanto, quando inoculada por via IT, essa amostra não causou doença clínica aparente, nem tampouco foi possível o isolamento de vírus do SNC. Ao exame histopatológico, vasos pulmonares e do SNC destes animais apresentavam intensa vasculite e trombose. Além disso, no SNC foi detectada necrose focal em neurônios corticais, sem lesões neuronais que pudessem ser atribuídas a um efeito citopático diretamente causado pelo vírus. Este quadro é semelhante ao descrito em vasculopatias oclusivas, como a provocada em humanos pelo vírus varicela-zoster (VZV; Amlie-Lefond et al. 1995, Caekebeke et al. 1990), em humanos, onde o VZV ocasiona uma trombose oclusiva que pode envolver mesmo vasos de maior calibre do SNC e de outras áreas, apesar da ausência de reações inflamatórias ou infiltrados leucocitários perivasculares, sem lesões neuronais específicas (Eidelberg et al. 1986). Patogenia semelhante igualmente foi descrita nas encefalites associadas à infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1), onde também pode ser observada uma síndrome de vasculopatia imunomediada, aliada à trombose, com conseqüente infarto do tecido nervoso afetado (Storts 1998). Assim, ainda que estudos anteriores tenham sugerido que esta estaria associada a casos de encefalite (Engels et al. 1986), seu comportamento em coelhos não sugere neurotropismo nem neurovirulência exacerbados, visto que o quadro neuropatológico observado nos coelhos não evidenciou lesões inequivocamente causadas por efeito direto do vírus em neurônios. Na verdade, o quadro neuropatológico resultante parece conseqüente à isquemia, e conseqüente anóxia tecidual, verificada após a trombose, o que provavelmente levou também à necrose de neurônios em algumas áreas do cérebro. Assim, a neurovirulência dessa amostra parece ser secundária à danos circulatórios.

Nas ocasiões em que o BHV-1 tem sido associado a encefalites em bovinos, supõe-se que o vírus invada e replique em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, a exemplo do que ocorre na encefalite por BHV-5 ou, nos humanos, pelo herpesvírus simples tipo 1 (HHV-1; Storts 1998). Nas raras encefalites provocadas por BHV-1 a campo, os achados histopatológicos podem revelar tanto lesões semelhantes àquelas causadas por BHV-5, incluindo lesões neuronais provocadas inequivocamente pelo efeito do vírus, incluindo com a presença de corpúsculos de inclusão (Horiuchi et al. 1995). Por outro lado, outros autores notaram a ausência de lesões características (Roels et al. 2000), em semelhança ao aqui descrito em coelhos inoculados com a amostra LA.

A amostra de BHV-1 Cooper, por sua vez, confirmando observações de outros pesquisadores (Chowdhury et al. 1997), produziu apenas sinais leves de infecção respiratória quando inoculada pela via IN. Porém, quando inoculada por via IT, não provocou qualquer alteração clínica. Igualmente, após inoculação por ambas as vias, não foi isolada a partir do SNC, demonstrando não apresentar neurovirulência, nem neuroinvasividade.

A amostra de BHV-5 aqui utilizada, ao contrário das amostras de BHV-1, foi capaz de replicar no tecido nervoso, tendo a mesma induzido sinais clínicos e lesões neuronais.

Além disso, o vírus foi isolado do SNC quando inoculado por ambas as vias, comprovando sua neuroinvasividade e neurovirulência. Por outro lado, ambas as amostras de BHV-1 inoculadas mostraram-se ineficientes em sua capacidade de replicação no SNC, demonstrando baixa neuroinvasividade e neurovirulência. A despeito de que alguns dos animais inoculados pela via IN com a amostra LA tenham desenvolvido sinais de comprometimento neurológico, tal comprometimento pareceu estar associado a danos no fluxo sanguíneo encefálico, e não a danos neuronais provocados diretamente pelo vírus.

É possível que as características de neurovirulência e neuroinvasividade aqui apresentadas pela amostra EVI 88/95 de BHV-5 tenham relação com o neurotropismo característico deste tipo de BHV em bovinos, em contraposição ao tipo 1, onde a ocorrência de encefalite é uma rara manifestação da infecção, em condições naturais. No futuro, buscar-se-á identificar os fatores responsáveis por esse peculiar neurotropismo de BHV-5.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao professor Rodolfo Voll, do Departamento de Medicina Animal da FAVET – UFRGS, pelo apoio ao presente estudo. Ao CNPq, PRONEX e FAPERGS pelo suporte financeiro. Os protocolos de experimentação utilizados no presente estudo estão em conformidade com os requerimentos de ética e bem-estar animal propostos pelo COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. P.M.R., R.W., E.F.F. e D.D. são pesquisadores bolsistas do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Almeida R.S., Melo S.V., Silva T.C., Oliveira L.G., Lemos R.A. & Roehle P.M. 1998. Produção de anticorpos monoclonais contra o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). *Pesq. Vet. Gaúcha* 4:67-72.
- Amlie-Lefond C., Kleinschmidt-Demasters B.K., Mahalingam R., Davis L.E. & Gilden, D.H. 1995. The vasculopathy of varicella-zoster virus encephalitis. *An. Neurol.* 37:784-790.
- 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.
- Bratanich A.C., Sardi A.I., Smitsäart E.N. & Schudel A.A. 1991. Comparative studies of BHV-1 variants by *in vivo* and *in vitro* tests. *J. Vet. Med. B* 38:41-48.
- Brown G.A. & Field H.J. 1990. Experimental reactivation of bovine herpesvirus (BHV-1) by means of corticosteroids in an intranasal rabbit model. *Arch. Virol.* 112:81-101.
- Caekebeke J.F., Peters A.C., Vandivik B., Brouwer O.F., & Baker H.M. 1990. Cerebral vasculopathy associated with primary varicella infection. *Arch. Neurol.* 47:1033-1035.
- Cascio K.E., Belknap E.B., Schultheis P.C., Ames A.D. & Collins J.K. 1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J. Vet. Diag. Invest.* 11:134-139.
- Carrillo B.J., Ambroggi A., Schudel A.A., Vazques M., Dahme E. & Pospischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *J. Vet. Med. B* 30:327-332.
- 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.
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Ozkul A. & Weiss M.L. 2000a. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 74:2094-106.

- Chowdhury S.I., Lee B.J., Onderci M., Weiss M.L. & Mosier D. 2000b. Neurovirulence of glycoprotein C(gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J. Neurovirol.* 6:284-95.
- Eidelberg D., Sotrel A., Houropian D.S., Neumann P.E., Pumarola-Sune T. & Price R.W. 1986. Thrombotic cerebral vasculopathy associated with herpes zoster. *An. Neurol.* 19:7-14.
- Engels M., Giuliani C., Wild P., Beck T.M., Loepfe E. & Wyler R. 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuro-pathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site map and cross hybridization. *Virus. Res.* 6:57-73
- French E.L.A. 1962. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust. Vet. J.* 38:216-221.
- Flores E.F., Silva A.M. & Weiblen R. 1998. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais. *Anais do Simpósio Internacional de Herpesvírus Bovino e Vírus da Diarréia Viral Bovina, Santa Maria, RS, p. 127-137.*
- Gardiner M.R. & Nairn M.E. 1964. Meningoencephalitis of calves in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 40:225-228.
- Gibbs E.P.J. & Rweyemamu M.M. 1977. Bovine Herpesviruses Part I. *Vet. Bull.* 47:317-343
- Hall W.T.K., Simmons G.C., French E.L., Snowdon W.A. & Asdell M. 1966. The pathogenesis of meningoencephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust. Vet. J.* 42:229-237.
- Horiuchi M., Yamazaki N., Furuoka H., Matsui T., Nakagawa M., Ishiguro N. & Shinagawa M. 1995. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *J. Vet. Med. Sci.* 57:577-80.
- Laskin O.L. & Griffin D.E. 1987. Changes in cerebrospinal fluid cells, IgG and IgA during herpes simplex virus encephalitis in rabbits. *J. Neuroimmunol.* 14:283-292.
- 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.
- Liman A., Engels M., Meyer G. & Ackermann M. 2000. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. *Arch. Virol.* 145:2047-59.
- Madin S.H., York C.J. & McKercher D.G. 1956. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 124:721-722.
- Metzler A.E., Schudel A.A. & Engels M. 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.* 87:205-217.
- Meyer G., Lemaire M. & Lyaku J. 1996. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.* 51:27-40.
- Meyer G., Bare O. & Thiry E. 1999. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *J. Gen. Virol.* 80: 2849-2859.
- Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblein R., Rock D. & Kutish G.F. 2001. The genome of bovine herpesvirus type 5: comparison with bovine herpesvirus type 1. *Virus Rev. and Res.* 6 (Suppl.1):119.
- Murphy F.A., Gibbs E.P., Horzinek M.C. & Studdert M.J. 1999. *Veterinary Virology*. 3rd ed. Academic Press, New York. 629 p.
- Oliveira I.G., Oliveira E.A.S., Silva L.H.T., Vieira L.A., Hoffmann V.L., Fernandes G.V., Silva T. C., Caldas A.P.F. & Roehle P.M. 1996. Presença de pestivirus e anticorpos contra pestivirus em soros e cultivos celulares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48:513-521
- Pringle J. 2000. Doenças do sistema respiratório superior. In: Ogilvie T.H. (ed.) *Medicina Interna de Grandes Animais*. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 131-150,
- Rock D.L., Hagemoser W.A., Osorio F.A. & Reed D.E. 1986. Detection of bovine herpesvirus type 1 RNA in trigeminal ganglion of latently infected rabbits by *in situ* hybridization. *J. Gen. Virol.* 67:2515-2520.
- Rock D., Lokensgard J., Lewi T. & Kutish G. 1992. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus type 1. *J. Virol.* 66:2484-2490.
- Roehle P.M., Silva T.C., Nardi N.B., Oliveira D.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.
- Roels S., Charlier G., Letellier C., Meyer G., Schynts F., Kerkhofs P., Thiry E. & Vanopdenbosh L. 2000. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.* 13:586-588
- Salvador S.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehle P.M. & Osório, A.L.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18:76-83.
- Silva A.M., Flores E.F., Weiblein R., Canto M.C., Irigoyen L.F., Roehle P.M. & Sousa R.S. 1999. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Revta Bras. Microbiol.* 30:22-31.
- Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S.R., Gonçalves D., Schaefer R., Silva T.C., Almeida R.S., Vicentini F.K., Franco A.C., Oliveira E.A.S., Spilki F.R., Weiblein R., Flores E.F., Lemos R.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehle P.M. 2002. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 22(1):13-18.
- Storts R.W. 1998. *Sistema Nervoso Central* In: Carlton, W.W & McGavin, M.D. *Patologia Veterinária Especial de Thomson*. 2ª ed. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 353-416.