

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**DETECÇÃO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM CORTES
HISTOLÓGICOS E FRAGMENTOS DE ENCÉFALO
CONGELADO PELA REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE**

Heitor Flávio Ferrari
Médico veterinário

ARAÇATUBA – SP

2007

**DETECÇÃO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM CORTES
HISTOLÓGICOS E FRAGMENTOS DE ENCÉFALO
CONGELADO PELA REACÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE**

Heitor Flávio Ferrari

**Orientadora: Prof^ª. Adj.Tereza Cristina Cardoso
Silva**

**Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Cecília Rui
Luvizotto**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
– Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e
Produção Animal).

Araçatuba – SP

2007

Candidato:

HEITOR FLÁVIO FERRARI

Título da dissertação:

**DETECÇÃO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM CORTES
HISTOLÓGICOS E FRAGMENTOS DE ENCÉFALO
CONGELADO PELA REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador Prof^a. Adj. Tereza Cristina Cardoso – UNESP Câmpus de Araçatuba SP

2º Examinador Prof^a. Adj. Jane Megid – DHVSP – FMVZ – Botucatu – SP

3º Examinador Prof. Adj. Iveraldo dos Santos Dutra – UNESP Campus de Araçatuba SP.

Araçatuba, 29 de Novembro de 2007

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Virologia, DAPSA e de Patologia, DCCRA, da Faculdade de Odontologia, do Curso de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba – SP.

Apoio:

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – Processo: 06/51663-06

DADOS CURRICULARES

HEITOR FLÁVIO FERRARI

NASCIMENTO 8.03.1982 – LOANDA-PR

FILIAÇÃO Sérgio Ferrari
 Edna Maria Zanutto Ferrari

2000/2004 Curso de Graduação
 Universidade Estadual Paulista - UNESP
 Araçatuba, SP.

2005-2006 Residência em Anatomia Patológica Veterinária
 Universidade Estadual Paulista - UNESP
 Araçatuba, SP.

À minha família, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de auxílio mestrado concedida. Processo 06/51663-06

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por me dar força para vencer cada obstáculo que aparece no dia-dia e pelas pessoas que fazem parte da minha vida.

Aos meus pais Sérgio e Edna por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis desta caminhada. Cada vitória conquistada na minha vida se deve ao esforço de ambos na minha formação como pessoa e profissional.

A minha avó Nair por ter investido em mim ao longo do meu desenvolvimento acadêmico, tanto na forma material como na confiança em mim depositada.

Ao meu irmão Tiago por ter me apoiado e sempre estando do meu lado nos momentos mais difíceis.

A minha namorada, amiga e companheira Analy, por estar ao meu lado durante dois anos das nossas vidas, sempre me apoiando nas minhas decisões e escolhas.

A professora Tereza Cristina Cardoso por ter me acolhido como orientadora no mestrado, mesmo não me conhecendo como aluno e profissional, mas que me deu um voto de confiança e acredito pela minha capacidade.

A Professora Maria Cecília Rui Luvizotto por ter me orientado durante todo o período da graduação, residência e por acompanhar de perto meu desenvolvimento ao longo do mestrado, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis.

A Professora Lucia, que me ensina de forma paciente como redigir melhor e que dedicou parte do seu tempo para a correção das paginas que compõem esta tese.

Aos meus amigos e funcionários da Patologia, José Cabrerizo e Magna por terem me ajudado com a orientação de como desenvolver a melhor técnica durante a realização de necropsia ou com a histopatologia.

Aos funcionários Gilmara e Cristiano pela amizade, confiança e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas de república, Alex, Rubens e Rogério por toda amizade e companheirismo que cultivamos ao longo desta passagem pela faculdade.

Ao secretário Pedro da Patologia

As bibliotecárias Isabel e Fátima que ajudaram na confecção desta tese e no apoio durante o desenvolvimento de cursos.

E a todos que contribuíram e fizeram parte deste trabalho, muito obrigado.

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conheceram”.

Thomas Wolfe

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
Considerações Gerais	17
Objetivos	40
Considerações finais	41
Referências	43
CAPÍTULO 2	59
Artigo Científico	60
ANEXO A	77
ANEXO B	84

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Tabela 1-	Membros da família <i>Herpesviridae</i> que acomete animais domésticos	05
FIGURA - 1	Esquema da partícula viral pertencente à Família <i>Herpesviridae</i> , Sub-Família <i>Alphaherpesvinae</i> .	04
FIGURA - 2	Esquema do ciclo de replicação viral da sub-família <i>Alphaherpesvinae</i>	08

LISTA DE ABREVIATURAS

BoHV-1 – Herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-5 – Herpesvírus bovino tipo 5

CRIB – Bovine kidney cell line

CER – Chicken embryo related cells

BSE – Encefalopatia espongiforme bovina

HSV-1 - Herpesvírus simplex – 1

IHC – Imunoistoquímica

MDBK – Madin Barby Bovine Kidney Cell Line

Mercosul – mercado dos países da América do Sul

OIE – Organização internacional de Epizootias

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PRV – Vírus da Pseudorraiva

S.N.C- Sistema nervoso central

U.E – União Européia

FERRARI, H. F. **DETECÇÃO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM CORTES HISTOLÓGICOS E FRAGMENTOS DE ENCÉFALO CONGELADO PELA REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE**. 2007. 94f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista. UNESP. Araçatuba 2007.

RESUMO

Meningoencefalite não supurativa causada pelo *Herpesvírus* bovino tipo 5 (BoHV-5) ocorre de forma endêmica em algumas regiões do Brasil, com ênfase no Rio Grande do Sul. No entanto, outras regiões possuem poucos relatos da ocorrência da doença, como os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. O presente trabalho objetivou realizar a classificação histológica das lesões desenvolvidas durante a infecção aguda pelo BoHV-5, no encéfalo de 20 animais naturalmente acometidos pelo infecção. As principais lesões observadas, em 80% dos animais, foram de meningoencefalite não supurativa, caracterizadas por infiltrado linfo-histiocitário inflamatório. Em 20% dos animais as lesões encontradas foram não significativas, mas nestes casos todos os bovinos desenvolveram sintomatologia neurológica, e o diagnóstico da doença foi confirmado na reação em cadeia pela polimerase (PCR), com amplificação do DNA do BoHV-5. Esta classificação histológica permitiu observar alterações compatíveis com a doença, mas também mostrou que nem sempre nestes casos vai ocorrer o desenvolvimento de alterações histológicas. Todas as amostras frescas (n=20) foram submetidas ao isolamento viral e a técnica da técnica de PCR. Já os fragmentos fixados em formol e incluídos em parafina foram testados quanto à presença do vírus por meio da técnica de PCR. As vinte amostras congeladas foram consideradas positivas para o isolamento viral e para a amplificação do DNA viral na técnica de PCR, enquanto apenas 15 das 20 incluídas em parafina foram consideradas positivas para o vírus. Os fragmentos de tecidos que apresentaram alterações histopatológicas permitiram suspeitar de infecção viral por BoHV-5, mas nos casos em que estas alteração não estão presentes testes mais sensíveis são necessários.

Palavras-chave: Meningoencefalite, infecção, herpesvirus 5 bovino, bovinos, necrose cortico cerebral.

FERRARI, H. F. **DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 FROM HISTOLOGICAL SECTIONS AND FRESH BRAIN SAMPLES BY THE USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION.** 2007. 94f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista. UNESP. Araçatuba 2007.

SUMMARY

Meningoencephalitis occasioned by Bovine *Herpesvirus* type 5 (BoHV-5) has been described as localized in some regions inside Brazil, like Rio Grande do Sul State and, also characterized as an endemic encephalitis disorder. However, the often description of its occurrence in São Paulo and Mato Grosso has being notice. The aim of this work was to first characterize the histologic lesions obtained from bovine brains suspected of suffering of neurological disorders. For this purpose, 20 brains were collected from acute cases of the disease, naturally infected by BoHV-5, confirmed by virus isolation and PCR. The most observed lesions were described as being: inflammatory cells, specially infiltrated lymphocytes (80%), necrosis (20%), and less focal gliosis and hemorrhage, in spite of these lesions have been characterized as no-specific. Brains were divided into two halves, one kept fresh for virus isolation and PCR assay, targeting the glycoprotein C gene from BoHV-5 genome. The other half brain, corresponding to cortex region, was submitted to formalin fixation and embedded into paraffin blocks for total DNA isolation. The 20 fresh samples were confirmed, by virus isolation and PCR assay, as having the BoHV-5 virus, while 15 of 20 formalin-fixed, paraffin-embedded samples were considered positive for the same analysis. Finally, the gross lesions and microscopic damage of the brain structure were sufficient for the virus infection suspicion, however it is necessary the complementary techniques to confirm the diagnosis in most of the cases.

Keywords: Meningoencephalitis, infection, Bovine Herpesvirus-5, Bovine, cortical cerebral necrosis.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil é considerado produtor de cerca de 14 milhões de toneladas/ano de carnes (bovina, frango e suína), gerando uma receita de 2,4 bilhões dólares/ano, em produtos "in natura" e seus derivados. O mercado dos países da América do Sul – denominado MERCOSUL, com a força da sua cadeia produtiva de alimentos tem alcançado índices altos nas taxas de exportação. Este fato deve-se à classificação recente de áreas livres de Febre Aftosa, sem vacinação compulsória, de algumas regiões, acarretando a sua liberação pela Organização Internacional de Epizootias – OIE, como o estado de Santa Catarina no Brasil, entretanto barreiras sanitárias importantes ainda necessitam ser revistas (CARNE...,2007).

O Brasil representa um dos mais importantes produtores de carne bovina e seus derivados do mundo, (6,3 milhões de toneladas/ano) e tem consumo "per capita" de 36,6 kg/ano. Ademais, o rebanho bovino brasileiro, em sua região central, (São Paulo, Minas Gerais, Goiás) é composto, predominantemente, de animais das raças zebuínas, enquanto os localizados nos estados do Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) possuem um rebanho predominante de raças européias. Em 2001, as importações brasileiras de carne bovina alcançaram 90 mil toneladas, enquanto suas exportações chegaram a 500 mil toneladas, com valor aproximado de 1 bilhão de dólares na receita cambial brasileira. Por outro lado, a indústria frigorífica brasileira reúne mais de 130 empresas, com grande importância e produção, distribuídas em todo seu território. Destas, aproximadamente 16 empresas, as de maior porte, estão habilitadas à exportação e situam-se na Região Sudeste, reunidas através da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes Industrializadas – (ABIEC), sendo responsáveis pela exportação de mais de 500 mil toneladas de carnes industrializadas/ano, para vários mercados, em especial, os de EUA, U.E., e países da ÁSIA (CARNE...,2007).

A previsão é que o Brasil apresente neste ano de 2007 uma participação no mercado mundial de carne bovina de 2,3 milhões de toneladas, volume 12,3% superior ao de 2006, perfazendo uma receita de US\$ 4,2 bilhões - 9,8% superior a anterior. O ritmo de crescimento das vendas externas brasileiras será maior que a taxa de seu principal concorrente, a Austrália, cuja estimativa é de aumento de 4,8% em volume neste ano e 4,9% para 2008. Ademais, o Brasil passou à frente dos australianos em volume em 2004 e em receita no ano passado. Pelos cálculos, o país continuará liderando o mercado nos próximos 10 anos, entretanto o crescimento pode ser menor, uma vez que as exportações brasileiras são compostas predominantemente por carne industrializada, sendo o produto "in natura" difícil de ser vendido para mercados mais exigentes, com barreiras sanitárias rígidas, principalmente, no que se refere às doenças virais (VALOR...,2007).

FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE*

Já foram caracterizados mais de 80 *Herpesvírus*, provenientes de insetos, répteis e anfíbios, assim como, de praticamente todas as espécies de aves e mamíferos (Tabela 1). As partículas virais dos *Herpesvirus* apresentam baixa resistência ao meio ambiente e, não possuem resistência fora do organismo infectado e, em geral, a sua transmissão requer contato direto para que ocorra a infecção viral (FENNER et al., 1992).

Os virions possuem um envoltório, cujo tamanho é de aproximadamente 150 nm, constituído por um capsídeo de simetria icosaédrica composto por 162 capsômeros. O seu genoma é constituído por uma dupla fita linear de ácido desoxiribonucleico (DNA), com 120-200 Kb, disposto por todo o núcleocapsídeo, onde as fitas se encontram ancoradas na porção interna do capsídeo (Figura 1).

CLASSIFICAÇÃO DOS *HERPESVIRUS*

A divisão das famílias em subfamílias se baseia nas propriedades biológicas, enquanto a classificação em gêneros baseia-se na disposição genômica e sorológica, respectivamente. Neste sentido, a subfamília *Alphaherpesvirinae* é constituída pelos *Alphaherpesvirus* caracterizados por sua ampla gama de hospedeiros, pelo seu desenvolvimento de lise celular e, sua capacidade de desenvolver infecções latentes nos gânglios nervosos. Referente à subfamília *Betaherpesvirinae*, seus hospedeiros são limitados apresentando ciclo de replicação longo. Já no cultivo celular a infecção é progressivamente lenta, desenvolvendo lise celular após vários dias após a infecção. As células infectadas com frequência aumentam de tamanho, originando o fenômeno conhecido de citomegalia. Os vírus podem permanecer de forma latente nas glândulas secretoras, tecido linfóide, rins e outros tecidos.

Por fim, a subfamília *Gammapherpesvirinae*, cujo seus hospedeiros são escassos, todos os respectivos membros replicam-se em células linfóides e algumas produzem infecções citocidas em células epiteliais e fibroblásticas. Os vírus desta subfamília são específicos de linfócitos T e B, que são transformados em células tumorais. Com frequência podem produzir infecção latente no tecido (FENNER et al., 1992).

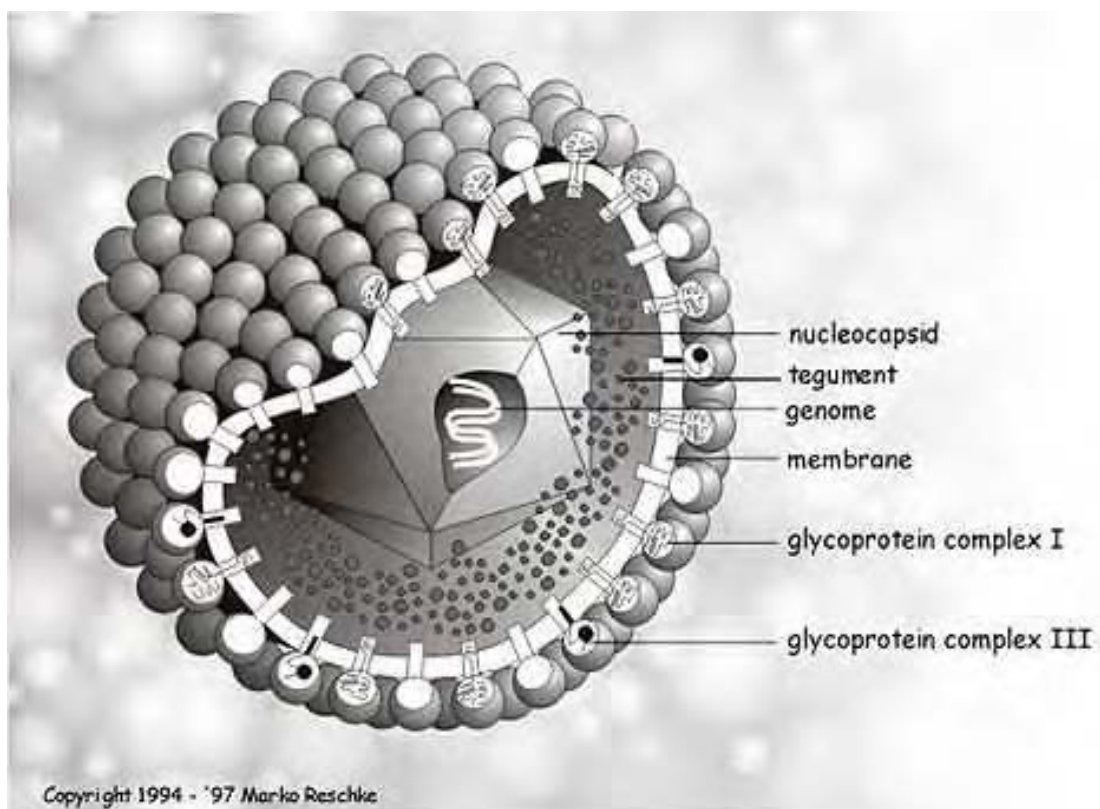


Figura 1- Esquema da partícula viral pertencente à Família *Herpesviridae*,
Sub-Família *Alphaherpesvinae*. (THE BIG... , 2007).

Tabela 1- Membros da família *Herpesviridae* que acomete animais domésticos.

Vírus	Sinônimos	Subfamília	Doença causada nos animais
Herpesvírus bovino tipo 1	IBR, BHV-1.1 e BHV1.2	A	Rinotraqueite infecciosa bovina, vulvovaginite pústular e balanopostite
Herpesvírus bovino tipo 2	Vírus da mamilite bovina	A	Mamilite bovina/ Dermatite Pseudo-Lumpy
Herpesvírus bovino tipo 4	Herpesvírus bovino orfam	γ	?
Herpesvírus bovino tipo 5	Herpesvírus encefalite bovina	A	Meningoencefalite
Herpesvírus caprino 1	BHV-6	A	Gastroenterite, vulvovaginite pústular, aborto
Herpesvírus ovino 1	BHV-4, BHV-5	ND	Adenomatose pulmonar associada a vírus
Herpesvírus ovino 2	Vírus da febre catarral maligna ovina	γ	Febre catarral maligna
Herpesvírus alcelaphine 1	Vírus da febre catarral maligna	γ	Febre catarral maligna
Herpesvírus alcelaphine2	Vírus da febre catarral maligna	γ	Febre catarral maligna
Herpesvírus eqüino 1	Vírus do aborto equino	α	Morte neonatal, aborto, rinopneumonia, mieloencefalopatia
Herpesvírus eqüino 2	EHV- 2	γ	?
Herpesvírus eqüino 3	Exantema coital	α	Exantema coital eqüino
Herpesvírus eqüino 4	EHV- 4	α	Rinopneumonia
Herpesvírus eqüino 5	EHV-5	γ	?
Herpesvírus eqüino 6	Herpesvírus Asinino 1	α	Lesões vesiculares e erosiva no muflo, genitália úbere.
Herpesvírus eqüino 7	Herpesvírus Asinino 2	γ	?
Herpesvírus eqüino 8	Herpesvírus Asinino 2	α	Rinite
Herpesvírus eqüino 9*	GEHV	α	Meningoencefalite ***(suínos, eqüinos e cabras)
Herpesvírus suíno 1	Aujeszky	α	Pseudorraiva
Herpesvírus suíno 2	Citomegalovírus	β	Corpúsculo de inclusão rinite.

COETZER, 2004.

 α - Alphaherpesviridae β -Betaherpesviridae

* Hospedeiro incerto

 γ - Alphaherpesviridae

NC- não classificado

*** Somente casos experimental

?-Desenvolvimento das lesões incerto

REPLICAÇÃO DOS *HERPESVÍRUS*:

A adsorção e penetração dos *herpesvírus* nas células hospedeiras são mediadas por várias proteínas do envelope viral (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). Acredita-se que a fusão do envelope viral com a membrana plasmática ocorra por meio do nucleocapsídeo e das proteínas do tegumento que obtém acesso ao citoplasma (FULLER; LEE, 1992; GRANZOW et al., 1997; SODEIK et al., 1997). Até o presente momento, não se conhece o número exato de glicoproteínas necessárias para essa ligação, fusão e penetração para os Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), é conhecido apenas que para o Herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1) são necessárias 4 glicoproteínas para o processo de fusão (LIANG et al., 1991; PEETERS et al., 1992; TURNER et al., 1998).

Estudos realizados, demonstram que o BoHV-1 e BoHV-5 apresentam 4 fases para realizar a sua penetração completa nas células do hospedeiro, denominadas de: adsorção, fusão, penetração e liberação. Cada fase, por sua vez, apresenta características próprias, como descritas a seguir (WILD et al., 1998).

1-Adsorção: ocorre pelo contato da membrana externa do vírus com a membrana plasmática da célula, mediado pelas glicoproteínas C e D.

2-Fusão: se dá pela penetração e pela intensa ligação entre o envelope viral e a camada interna da membrana plasmática da célula do hospedeiro.

3-Penetração: ocorre pelo processo de endocitose da membrana plasmática próximo ao local de fusão, e as partículas virais se encontram no interior da célula.

4-Liberação: após a formação do DNA viral ocorre a entrada do material genético viral no nucleocapsídeo pré formado e sua liberação para o meio extracelular.

Todo este processo de adsorção e penetração viral está completo após 60 segundos de ter iniciado o contato com a célula alvo, observado em ensaios experimentais (WILD et al., 1998).

No interior do citoplasma celular o vírus passa para o núcleo e a enzima polimerase II viral dependente de DNA celular, transcreve 3 classes de RNA: α (alfa), β (beta) e γ (gama), segundo uma sequência coordenada e regulada por enzimas celulares. Assim, o RNA α processa o respectivo RNAm, que transcreve proteínas tipo α , que iniciam a expressão do RNAm β , e quando se tem a produção de β proteínas, suprime a transcrição de RNAm α . Nesse momento, começa a replicação do DNA viral, que se utiliza das proteínas α e β , assim como, proteínas das células hospedeira. A transcrição se inicia novamente, quando ocorre a formação do RNAm γ , transcrito a partir de seqüências distribuídas por todo o genoma, produzindo proteínas γ . Durante todo o ciclo são codificadas mais de 70 proteínas virais e grande parte destas são do tipo α e β , consideradas enzimas e a maioria das γ consideradas estruturais (FENNER et al., 1992).

O DNA viral, quando depois de formado no núcleo da célula hospedeira utiliza um mecanismo de “círculo rotatório”, o genoma converte-se em forma circular mediante a união das seqüências terminais, para que não ocorra mais a transcrição. O DNA recém sintetizado é introduzido no capsídeo pré-formado. A síntese de DNA, RNA e proteínas da célula hospedeira reduz à medida que começa a biosíntese viral e cessa 3-5 horas após a iniciada a infecção (FENNER et al., 1992).

A formação do nucleocapsídeo e, associação direta com a porção interna da membrana nuclear, promove a aquisição do envelope. Os virions maduros se acumulam no interior de vacúolos citoplasmáticos e, podem ser liberados lentamente, pela fusão da membrana vacuolar, pelo mecanismo conhecido como exocitose. Da mesma forma, observam-se proteínas virais, específicas, possivelmente similares as que se associam com a membrana nuclear e, determinam os sítios específicos de ancoragem dessas núcleoproteínas na membrana plasmática, no exato momento da fusão celular. Esses por sua vez,

podem atuar como receptor Fc (fixação de complemento) e acredita-se que constituem os pontos de ação da resposta imunológica (Figura 2).

Os corpúsculos de inclusão são característicos de infecção por *Herpesvirus* e, geralmente, podem ser observados, tanto nos tecidos dos animais infectados, bem como em cultivos celulares (FENNER et al.,1992)

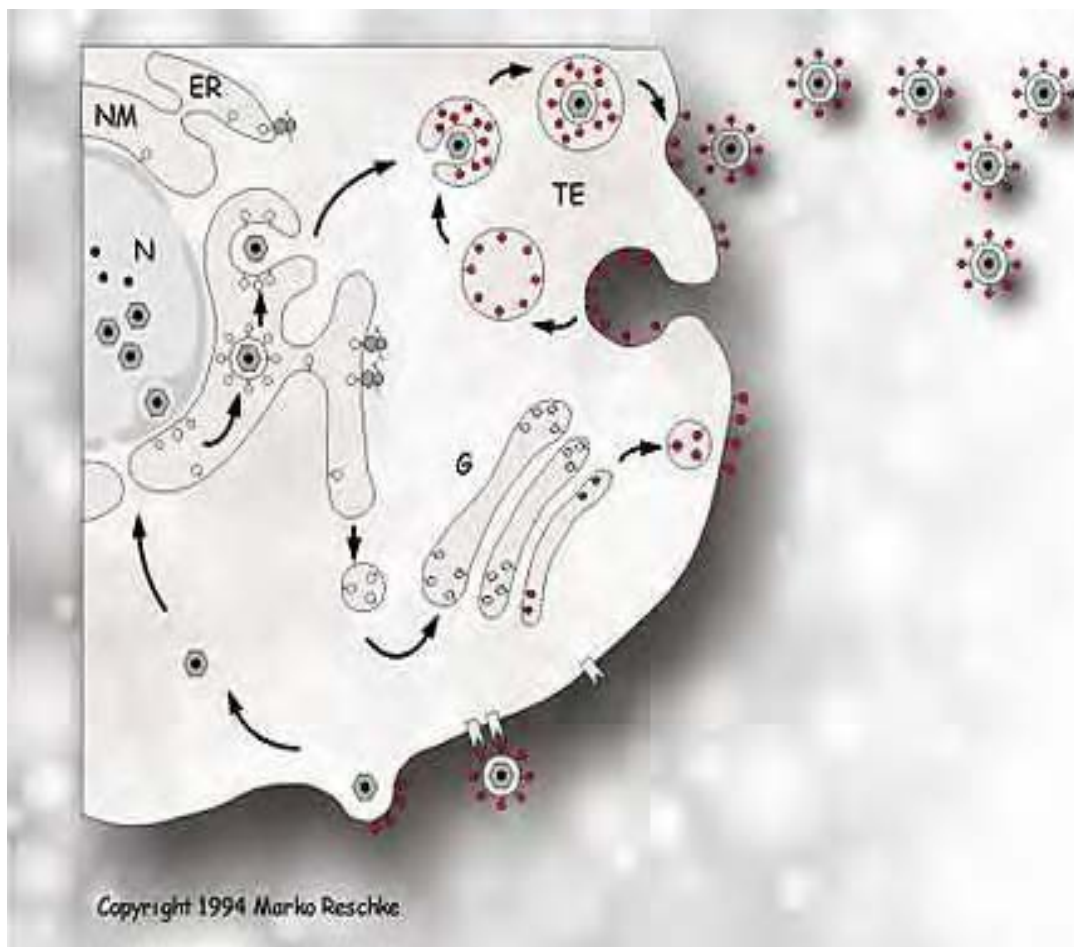


Figura 2- Esquema do ciclo de replicação viral da sub-família *Alphaherpesvirinae*: N

- núcleo, NM – Membrana Nuclear, ER – Retículo Endoplasmático, TE
- Exocitose, G - Golgi (THE BIG..., 2007).

GLICOPROTEÍNAS DO *HERPESVÍRUS* BOVINO TIPO 5.

Os alphaherpesviridae expressão na superfície de seu capsídeo glicoproteínas que são denominadas como essenciais ou não essenciais, relacionadas principalmente com o processo de adsorção, virulência e disseminação do vírus no SNC. (BABIUK et al., 2004). Dentre as glicoproteínas pode se listar as seguintes:

As glicoproteínas B (gB) e/ou C (gC) estão relacionadas com o processo de adesão, nos vírus pertencentes a família *Alphaherpesviridae*. Este processo ocorre, logo após ligação destas glicoproteínas com os glicosaminoglicanos da célula hospedeira (SPEAR et al., 1992).

A glicoproteína D (gD) é essencial para o processo de penetração (FEHLER et al., 1992) e as células que expressão esta glicoproteína são resistentes a infecção por vírus que apresentam glicoproteínas homólogas (CHASE et al., 1990). Após a expressão desta gD, derivada o Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1), na superfície de células MDBK e o seu desafio com o vírus BoHV-1, Pseudorabiva (PRV), Herpesvirus simplex-1 (HSV-1), constatou-se uma resistência parcial, já quando se utilizou o Herpesvirus Bovino tipo 5 (BoHV-5), houve ausência desta resistência (DASICA; LETCHWORTH; 2000).

O gene que codifica a glicoproteína E (gE) presente no envelope viral possui papel primordial na dispersão do vírus dentro do sistema nervoso central (SNC) de coelhos experimentalmente infectados (CHOWDHURY et al., 2000).

A glicoproteína I (gI) está relacionada com a virulência, comprovada por estudos envolvendo vírus recombinante sem a presença do gene que codifica a glicoproteína, resultando na diminuição significativa de infecção, quando comparado com BoHV-5 provenientes de surtos da doença a campo (KAASHOEK et al., 1998). A gI e gE, como já estabelecido pertence a um complexo de glicoproteínas que está

envolvido com a disseminação do vírus entre os axônios neuronais (ENQUIST et al., 2002; ZUCKERMANN et al., 1988).

O papel funcional da proteína transmembrana conhecida como US9, na disseminação viral nos receptores olfatórios dos neurônios e posterior localização no bulbo olfatório de bovinos. Os vírus com deleção desta proteína perdem sua virulência e foram incapazes de invadir o SNC quando inoculados na cavidade nasal de coelhos (CHOWDHURY et al., 2002).

No estudo conduzido por Hubner et al. (2005), a deleção das gE, gI e proteína US9 do BoHV-5, com posterior inoculação viral em coelhos, mostraram diminuição da infecção viral, não sendo possível observar alterações histopatológicas no cérebro dos animais inoculados. A realização das técnicas de imunistoquímica (IHC) e da reação em cadeia pela polimerase (PCR) confirmou a presença viral em amostras de encéfalo, como nas regiões da ponte, medula oblonga, mesencéfalo e gânglio trigêmeo.

A proteção cruzada contra o BoHV-5 produzida por meio da utilização de vacinas destinadas a imunização dos animais contra o BoHV-1, ainda não está claramente definida, apesar de existir uma reação cruzada entre ambos os vírus em métodos sorológicos (CASCIO et al., 1999; SPILKI et al., 2004). Nas condições de campo, Veterinários tem recomendado a vacinação com antígenos de BoHV-1 na tentativas de controlar surtos de encefalite por BoHV-5 (SALVADOR et al., 1998).

Silva et al. (2006) ao utilizar uma vacina recombinante do vírus BoHV-1, sem a presença da gE, notou que os animais imunizados, coelhos e bovinos, desenvolveram respostas diferentes na presença do BoHV-5. Os coelhos não apresentaram resposta imune contra o BoHV-5, desenvolvendo alterações neurológicas. No entanto, parte dos bovinos desenvolveu imunidade que não foi capaz de prevenir a enfermidade nem a eliminação do vírus.

HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5

O BoHV-5 é o agente infeccioso membro da família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, responsável pela meningoencefalite necrótica em animais jovens, que acarreta significantes perdas econômicas no gado de corte no Brasil e por todo o mundo (FAUQUET et. al., 2004; ROIZMAN, 1992; STUDDERT, 1989). Entretanto, BoHV-5 tem sua distribuição geográfica limitada, com alta incidência de doenças neurológicas em países da América do Sul, principalmente Brasil e Argentina, sendo em outras partes do mundo o seu relato esporádico (ACKERMANN; SCHWYZER, 1996; HOURIUCHI et al., 1995; PESHEV et al., 1998;).

O BoHV-5, até o ano de 1992, era classificado como subtipo 1.3 do BoHV-1, em virtude da similaridade genética entre as duas partículas virais, incluindo sua morfologia, efeito citopatogênico na cultura de células e, a não diferenciação entre ambos, nos testes de imunofluorescência e soroneutralização (WILD et al., 1998; EUGSTER et al., 1975; FRENCH, 1962). Estudos filogenéticos, baseados nas glicoproteínas B e D, evidenciaram semelhanças entre o BoHV-1 e o BoHV-5 (ROS; BELAK, 1999). Ademais, a comparação entre as duas partículas virais pelo uso de estudos “in vitro”, revelou diferenças genéticas e antigênicas nas análises de restrição enzimática dos respectivos DNAs (ENGELS et al., 1986; BRAKE; STUDDERT, 1985), testes de neutralização cruzada (BAGUST; CLARCK, 1972; METZLER et al., 1986), especificidade dos anticorpos monoclonais, amplificação da região genômica timidina quinase (Tk-gene) (METZLER et al., 1986) e caracterização das glicoproteínas C (CHOWDHURY, 1995), D (ABDELMAGID et al., 1995), G (ENGELHARDT; KEIL, 1996), H (MEYER et al., 1999), e E (CHOWDHURY et al., 2002).

Em efeito, o BoHV-1 e BoHV-5 não podem ser diferenciados com o emprego de métodos sorológicos e virológicos convencionais, devido a alta homologia genética, aproximadamente 85% entre os dois protótipos virais. Entretanto, com relação à propriedade neurotrópica, estes podem ser bem diferenciados (ASHBAUGH et al., 1997; CHOWDHURY, 1995). O BoHV-1 pode ser, ocasionalmente, neuroinvasivo com potencial de replicação local, mas raramente causa encefalites e, restringe-se aos casos de doenças respiratórias e genitais. No entanto, BoHV-5 tem neurotropismo marcante, com replicação no SNC e está incriminado como agente etiológico na neuropatogênese dos casos de meningoencefalite não supurativa, freqüentemente conduzindo o animal a morte (BELKNAP et al., 1994; FLORES et al., 1998; STUDDERT, 1989).

As partículas virais do BoHV-1, quando inoculadas pela via intranasal em coelhos, são capazes de induzir doença respiratória com a presença de sinais clínicos de comprometimento nervoso, sendo possível o re-isolamento viral, tanto do pulmão, quanto do encéfalo. Nos casos em que o vírus está associado à encefalite bovina, ocorre invasão e replicação em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, como descrito no quadro encefálico por BoHV-5 (SPILKI et al., 2002).

Recentemente, o BoHV-1 foi incriminado como o agente causador de lesões neurológicas em bovinos, com sua identificação pelas técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), digestão enzimática, e seqüenciamento da glicoproteína C. Em contrapartida, essas amostras, quando submetidas a inoculação experimental em coelhos, não foram capazes de desenvolver os mesmos sintomas observados nos animais acometidos pelos quadros de encefalite (SILVA, et al., 2007). De acordo com esses autores, nestes casos, o vírus não foi o responsável principal da doença, sendo sua replicação no cérebro resultado da reativação de uma infecção latente. Existem duas hipóteses para explicar a presença do BoHV-1 no encéfalo dos

animais: (i) nos casos em que o bovino apresenta sintomatologia clínica de doença respiratória, sem alteração neurológica; (ii) nos animais com lesão encefálicas, mostrando que o vírus tem habilidade de causar infecção e enfermidade como o BoHV-5 (SILVA et al., 2007).

Nos raros episódios de encefalite por BoHV-1, ocorridos no campo, os achados histopatológicos podem revelar, tanto lesões semelhantes às aquelas ocasionadas por BoHV-5, incluindo lesões neuronais provocadas, inequivocamente, pelo efeito do vírus e, conseqüentemente, ocasionando a formação de corpúsculo de inclusão (HORIUCHI et al., 1995). No entanto, outros autores revelam a ausência de lesões características (ROELS et al., 2000; SPILKI et al., 2002). A análise do genoma do BoHV-5 revelou diferenças importantes em relação ao BoHV-1, sendo provável que a neuropatogenicidade esteja relacionada a interação de vários produtos genômicos, muitos dos quais, ainda não analisados (FLORES et al., 1998).

É importante ressaltar que o BoHV-5 já foi, ocasionalmente, isolado de cérebro de bovinos acometidos por outra doença neurológica, tal como a raiva (SPILKI et al., 2003).

Testes sorológicos de rotina, muitas vezes, são incapazes de distinguir entre o BoHV-1 e o BoHV-5, devido a sua semelhança antigênica. Esta característica de homologia confere proteção cruzada entre os vírus, através da imunização ativa e passiva, que já fora demonstrada experimentalmente em bovinos (CASCIO et al., 1999; BELKNAP et al., 1994). Essa reatividade cruzada tem sido responsabilizada, em parte, pela baixa prevalência do BoHV-5 e, pela ocorrência rara da enfermidade neurológica, em países que vacinam bovinos regularmente contra o BoHV-1 (D'OFFAY et al., 1995; STUDDERT, 1989). Entretanto, estudos afirmam que os maiores índices de proteção, observados entre coelhos imunizados com BoHV-1, são atribuídos a dose viral utilizada, bem como a possível influência de diferenças

antigênicas, produzindo uma resposta mais eficaz em termos de proteção ao desafio. (BELTRÃO et al., 2000).

A via de acometimento do SNC em bovinos pelo BoHV-5 tem sido amplamente estudada, e várias são as teorias sugeridas, contudo, nenhum trabalho é conclusivo a este respeito (BELKNAP et al., 1994; FLORES et al., 1998). Estudos demonstraram que a via olfatória é a principal porta de entrada para a infecção do SNC, em modelos experimentais, conduzidos em coelhos (LEE et al., 1999) e bovinos (BAGUST; CLARK, 1972). Entretanto, o nervo trigêmeo, tem sido descrito, como a região por onde partículas virais disseminam-se por todo o encéfalo. (CHOWDHURY et al., 1997; BAGUST; CLARK, 1972).

Em contrapartida, os resultados encontrados por Diel et al (2005) demonstraram que, tanto a via olfatória como a do nervo trigêmeo, podem servir de acesso para o BoHV-5 em coelhos após inoculação experimental.

O BoHV-5 é neuroinvasivo e neurovirulento tanto em infecção natural quanto na experimental em bovinos (BELKENAP et al., 1994; BELTRÃO et al., 2000; CASCIO et al., 1999; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002) e, após a inoculação experimental em ovelhas (SILVA, et al., 1999) e coelhos (BELTRÃO et al., 2000; CARON et al., 2002; CHOWDHURY, et al., 1997; LEE et al., 1999;). Durante a infecção aguda, o vírus pode ser isolado de várias regiões do cérebro com titulação viral, variando de moderada à elevada (BELTRÃO et al., 2000; CARON et al., 2002; CHOWDHURY, et al., 1997; MEYER et al., 2001). Embora, a doença neurológica, seja freqüentemente fatal, já foram notificados casos de titulação viral baixa, seguido da apresentação de sinais clínicos intensos (BELKENAP et al., 1994; BELTRÃO et al., 2000; CARON et al., 2002; CASCIO et al., 1999; PEREZ et al., 2002).

Como outros *Alfaherpesvirus*, o BoHV-5 estabelece uma infecção latente, prolongada nos gânglios sensoriais, dos animais que sobrevivem à infecção aguda.

A reativação da infecção latente pode ocorrer de forma natural ou por estímulos induzidos, fornecendo, dessa forma, condições necessárias para a sua transmissão para outros animais (CARON et al., 2002; CASCIO et al., 1999; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002). Vale ressaltar que, a indução da doença natural ou artificial, em bovinos ou nos modelos experimentais, é acompanhada, freqüentemente, de sintomatologia nervosa, variando na sua intensidade (BELTRÃO et al., 2000; CARON et al., 2002).

A localização ocular, nasal, oral e nos gânglios sensoriais, principalmente, no gânglio do nervo trigêmeo, da infecção pelos *Herpesvírus* acarreta a forma latente da doença, em humanos, com a infecção pelo HSV-1 e em bovinos infectados pelo BoHV-5, BoHV-1 e, em suínos pelo vírus da PRV (ASHAUGH et al., 1997; CHEUNG, 1995; CROEN, 1991; STEINER; KENNEDY, 1995;).

SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS

Em relação aos sinais clínicos da doença, estes estão relacionados ao grau de comprometimento encefálico, com evolução variável de incubação de 3-10 dias, sendo aos 15 dias o período onde os sintomas são evidenciados. Os sintomas têm sido descritos como: depressão, isolamento do rebanho, tremores, nistagmo, bruxismo, pitialismo, ataxia, hipermetria, andar em círculos, movimentos de pedalagem, paralisia, decúbito esternal, convulsões e morte (BELTRÃO et al., 2000; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002;).

Segundo Salvador et al. (1998), em estudo epidemiológico, as alterações macroscópicas estão ausentes, em grande parte dos encéfalos, ou apresentam alterações pouco específicas, como congestão, hemorragia e edema. Nesse sentido, as alterações macroscópicas nem sempre são visualizadas na meningoencefalite

por BoHV-5, mas quando presentes, são caracterizadas por hiperemia e congestão dos vasos da leptomeninge, tumefação das porções anteriores do telencéfalo, com áreas achatadas no tálamo, cápsula interna, ventrículo lateral e córtex occipital de coloração amarelada ou acastanhada, medindo 0,5 a 3cm de diâmetro (RIET-CORREA et al., 2006; RISSI et al., 2006; SAVADOR et al., 1998).

Da mesma forma, as cavitações nos núcleos da base, com tamanhos de até 2 mm de diâmetro, contendo líquido no seu interior, hemorragias multifocais na substância cinzenta e branca, áreas de malácia na substância cinzenta, caracterizada por áreas focais ou de extensões variáveis de coloração amarela e consistência amolecida, algumas vezes gelatinosas e acinzentadas, são geralmente evidenciadas (RISSI et al., 2006; ELIAS et al., 2004).

LESÕES HISTOPATOLÓGICAS

A análise histopatológica dos fragmentos do encéfalo revela como alteração principal, a meningoencefalite não supurativa, caracterizada por reação inflamatória intensa, com presença de manguitos perivasculares, localizados na substância branca, bem como na cinzenta, constituídos por linfócitos e células mononucleares indiferenciadas, plasmócitos, poucos macrófagos e alguns neutrófilos, dispostos em camadas sobrepostas. A meningite difusa e severa, composta por infiltrado inflamatório, com mesma característica ao encontrado na substância cinzenta, também é uma alteração microscópica muito freqüente (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2006; SAVADOR et al., 1998).

Contudo, as alterações degenerativas são representadas por áreas extensas de malácia, com presença de macrófagos de citoplasma abundante, associados às células de Gitter, que estão localizadas na camada mais superficial, ou região sub-

meningeana, concomitante vacuolização da neuropila. Da mesma forma, a necrose neuronal intensa, representada pela presença de neurônios eosinofílicos, retraídos, com aumento do espaço peri-neuronal, atingem grandes extensões do córtex e são observadas com frequência. Alterações como neuronofagia, gliose multifocal, corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos, no interior de neurônios e astrócitos, sendo mais comum neste último, são consideradas alterações características da infecção viral (PEREZ et al., 2002; RISSI et al., 2006).

As secções histológicas, também demonstram alterações circulatórias constituídas por congestão, hemorragia e edema, distribuídos tanto na substância branca, quanto na cinzenta, também na meninge, que apresenta hiperplasia do endotélio vascular, vasculite, e tumefação das células endoteliais (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2006; RISSI et al., 2005;). De acordo com Salvador et al. (1998), as alterações circulatórias encontram-se presentes de forma discreta ou, muitas vezes, ausentes, sendo representadas somente por áreas de hemorragia.

A realização de imunomarcacão em cortes de tecidos, que apresentam alterações histopatológicas, de degeneração neuronal, corpúsculo de inclusão e infiltrado inflamatório perivascular, evidenciaram reação positiva para o BoHV-5 no interior de neurônios, células da glia e macrófagos. No entanto, o teste de imunofluorescência indireta (IFI) vem sendo descrita como uma técnica inferior à imunoperoxidase, na capacidade de detectar o antígeno viral no tecido fresco. Os resultados da literatura revelam sensibilidade diminuída da IFI, em relação à imunoperoxidase, em decorrência das diversas reações de amplificação, empregadas na IHC, como, por exemplo, o complexo avidina biotina (D' OFFAY et al., 1995). Esse mecanismo proporciona uma amplificação da reação em até dez vezes sua intensidade, o que favorece a detecção de epítomos virais pequenos ou em pouca quantidade nos tecidos analisados.

DIAGNÓSTICO DA ENCEFALITE VIRAL

As técnicas convencionais de vírus-neutralização, imunofluorescência direta e/ou indireta e imunoperoxidase são as mais utilizadas para o diagnóstico da infecção viral, realizadas em amostras clínicas, entretanto essas não permitem a diferenciação entre BoHV-1 e/ou BoHV-5 (GIAVEDONI et al., 1988).

No isolamento viral, o sistema de cultivo celular contínuo, os *Alphaherpesvírus* replicam-se rapidamente e produzem efeito citopático característico. As células, mais utilizadas para este propósito, são as derivadas de células bovinas, como a MDBK (Madin Barby Bovine Kidney Cell Line) (CARDOSO et al., 2007). Entretanto, trabalhos revelam baixa sensibilidade deste método, no que se refere ao isolamento direto do BoHV-5 de amostras clínicas. Neste sentido, na avaliação de trinta e um casos, com diagnóstico histopatológico de meningoencefalite não supurativa, somente treze das trinta e uma amostras foram capazes de propiciar o isolamento viral (BLANCO-VIEIRA et al., 1998). Vários autores relatam essa dificuldade no isolamento do agente viral, de materiais provenientes de animais naturalmente infectados, também dos animais infectados experimentalmente por via intranasal, que da mesma forma, apresentaram sintomatologia neurológica e diagnóstico histológico de encefalite (CARRILLO, 1982; CASCIO et al., 1999;).

O uso de cultura de células para o isolamento do *Herpesvírus* não é recomendado, em decorrência das variações nos títulos virais para cada região do encéfalo em particular, o que sugere, dependendo da área escolhida, diferentes concentrações de partículas viáveis, o que acarreta falha neste procedimento (BELKNAP et al., 1994; PEREZ et al., 2002).

Na rotina laboratorial, as amostras clínicas são, freqüentemente, fixadas em formol tamponado a 10% e embebidas em parafina, para a realização da análise

histopatológica. Embora a arquitetura do tecido, e das proteínas seja preservada, a extração de alta qualidade dos ácidos nucleicos pode ser problemática, devido à degradação da molécula de DNA. No entanto, estas amostras formam uma inestimável fonte para os estudos moleculares e realização das correlações clínicas (COOMBS, et al., 1999; FERRARI et al., 2007).

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem auxiliado no diagnóstico específico, em animais e humanos infectados pelos diversos *Herpesvírus*. A amplificação do material genômico viral por “nested” PCR, representa o método mais sensível para pequenas amostras de material genético fixado em parafina (OKIJIM, 2003). Contudo, técnicas recentes de biologia molecular foram desenvolvidas especificamente para o BoHV-5 na detecção do DNA viral, durante infecções agudas e latentes (FERRARI et al., 2007; MEYER et al., 2001).

É importante ressaltar que a utilização da técnica de PCR se faz imprescindível, pois as alterações histopatológicas são semelhantes às observadas em outras enfermidades virais (SPILKI et al., 2003) e, ademais o isolamento viral com a utilização de soro fetal bovino, pode acarretar a contaminação por agentes heterogêneos, tais como fungos, bactérias, vírus, ácido nucleico e príons (MERTEN, 2002).

Relatos revelam a localização do DNA viral nos casos de infecção por BoHV-5, prevalentemente, no córtex posterior, bulbo olfatório, ponte, mesencéfalo e tálamo. Entretanto, a presença do antígeno viral, normalmente evidenciado pela técnica de IHC, revela que, os animais infectados de forma latente não possuem imunomarcagem para o vírus no SNC. Por outro lado, animais que demonstraram a reativação viral desenvolveram reações positivas que, provavelmente, está relacionado com o aumento na concentração das partículas virais (VOGEL et al., 2003).

HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO BRASIL

A infecção por BoHV-5 é responsável por uma patologia classificada como meningoencefalite não supurativa, enfermidade presente em certas regiões do país, como o Rio Grande do Sul, descrita principalmente por surtos, com morbidade variável e letalidade alta, embora em alguns casos os animais possam sobreviver (ELIAS et al., 2004).

A enfermidade foi descrita no Rio Grande do Sul (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 1989), Mato Grosso do Sul e São Paulo (SALVADOR et al., 1998), Paraná (HALFEN; VIDOR, 2000), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Rio de Janeiro e Minas Gerais (GOMES et al., 2002), Pará (RIET-CORREA et al., 2006). Os surtos têm sido observados em bezerros de até 3 meses (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 1989,) e bovinos adultos de até 6 anos (ELIAS et al., 2004; SALVADOR et al., 1998). O diagnóstico da infecção pelo BoHV-5 baseia-se nos achados clínico-epidemiológicos, de necropsia e histopatologia, confirmado pelo concomitante isolamento e identificação do vírus (SALVADOR et al., 1998).

No entanto, em outras regiões do país, as enfermidades que acometem o SNC também ocorrem, e a pesquisa do agente etiológico muitas vezes não é determinada, destacando-se o estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Até o presente momento, existem apenas dois trabalhos que confirmam a presença do vírus nestes estados (GOMES et al., 2002; SALVADOR et al., 1998), sendo necessário ressaltar, a importância deste vírus no diagnóstico diferencial das doenças encefálicas de importância econômica como encefalite espongiforme (BSE) e a raiva.

Segundo Lovato (1998) e Roehe et al. (1998) a infecção pelo BoHV-5 é de curso geralmente fatal, e afeta principalmente animais jovens no Brasil. No entanto, estudo retrospectivo realizado por Ely et al. (1996), utilizando a PCR em amostras

incluídas em parafina, revelou 71% de positividade para o BoHV-5 em animais com idade variando de dois a quatro anos. Em estudos realizados por Gomes et al. (2002), a prevalência do vírus na região sudeste foi descrita em dois casos de encefalite viral, diagnosticados pela técnica de PCR de material incluído em parafina, com idade de 15 e 6 meses, respectivamente.

A estirpe viral de BoHV-5 representativa da maioria dos casos isolados de surto no Brasil e que tem sido caracterizado por inúmeros estudos é a EVI 88/95 (SILVA et al., 1996; SOUZA, et al., 2002). De acordo com D' Arce et al. (2002), alguns virions isolados no país foram caracterizados como BoHV-5 e identificados como 5a (referindo-se a linhagem australiana do vírus N569) que difere da linhagem argentina A663 (5b). Após a realização da análise de enzima de restrição (RFLP), foi identificado um terceiro grupo viral, sendo denominado subtipo 5c ou não "a" não "b", que apresenta característica diferente das previamente descritas para ambos os subtipos anteriormente classificados.

Outras enfermidades que acometem o SNC de bovinos, como a raiva, a listeriose, a poliencefalomalácia e a BSE apresentam sintomatologia clínica muito semelhante. A raiva bovina amplamente disseminada em algumas regiões do Brasil tem sido considerada a suspeita clínica primária, nos casos de encefalite bovina em várias regiões do país (GOMES et al., 2002).

A raiva é reconhecida como a maior causadora de encefalite em bovinos na América do sul. O resultado negativo de amostras de encéfalo, com sintomatologia neurológica submetidas à pesquisa do vírus rábico, na sua grande maioria, é arquivado sem a definição do agente etiológico. No entanto, estudos mostram que outros patógenos podem estar envolvidos com os quadros de encefalite, em amostras negativas e positivas para a raiva, podendo haver infecção mista pelo BoHV-5 e o vírus rábico. Várias suposições são feitas nos casos de

infecção mista ou primária, entretanto, a mais compatível seria a infecção latente pelo BoHV-5, sendo a infecção pelo *Lyssavirus* um fenômeno biológico para a reativação virall (SPILKI, et al., 2003).

A presente pesquisa está fundamentada na escassez de estudos relativos aos métodos empregados no diagnóstico etiológico de encefalites não supurativas identificadas no exame anatomopatológico, suspeitas de um possível envolvimento do BoHV-5, especialmente em bovinos do estado de São Paulo.

O emprego de técnicas moleculares é inovador, como coadjuvante ao diagnóstico morfológico na área de Anatomia Patológica Veterinária, sendo indispensável na pesquisa de agentes infecciosos virais, já que possui alta sensibilidade e especificidade.

A padronização da técnica de PCR em cortes histológicos permitirá incluir, mais um instrumento que poderá ser empregado na rotina de diagnóstico e em pesquisas futuras. O emprego de técnicas moleculares, associadas a histopatologia, propiciará a compreensão da etiopatogenia desta alteração do sistema nervoso central que acomete os bovinos.

2- OBJETIVOS

1- Detectar o *Herpesvírus* bovino tipo 5 (BoHV-5) nos casos de diagnóstico morfológico de encefalite não supurativa, em bovinos provenientes da região Sudeste e de algumas cidades do Mato Grosso do Sul, cuja etiologia não foi determinada no exame histopatológico do sistema nervoso central.

1.1.- Empregar a técnica de PCR em materiais parafinizados;

1.2- Empregar a técnica de PCR em materiais congelados;

2- Promover o isolamento viral em infecção de monocamadas de células MDBK, acompanhando o aparecimento de efeitos citopáticos, e detectar DNA viral por PCR, a partir de amostras de monocamadas.

3- Fazer a análise histopatológica dos cortes histológicos de sistema nervoso central, determinando as alterações microscópicas presentes nas amostras de encéfalo com diagnóstico morfológico de meningoencefalite não supurativa.

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. No presente estudo foi possível isolar em células MDBK, CRIB e CER após 3 passagens consecutivas o BoHV-5 de 20 suspensões de encéfalos, com suspeita de meningoencefalite não supurativa, com diagnóstico negativo para raiva animal;
2. No sobrenadante das células infectadas, após a terceira passagem consecutiva, foi possível detectar a presença do DNA viral, pela amplificação da região conservada da Glicoproteína C;
3. Nos materiais fixados e incluídos em parafina, foi possível a extração do DNA viral, e sua posterior amplificação pela reação de "polimerase chain reaction" (PCR), da região da Glicoproteína C do BoHV-5;
4. As lesões histopatológicas foram determinadas, sendo compatíveis com infecção viral, entretanto não foram suficientes para a confirmação da infecção pelo BoHV-5, mas sendo importante instrumento que levou a suspeitar de infecção encefálica em sistema nervoso central.

4- REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, O. Y.; MINOCHA, H. C.; COLLINS, J. K.; CHOWDHURY, S. I. Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal Abs and sequence comparison with BHV-5 gD. **Virology**. v. 206, p. 242-253, 1995.

ASHBAUGH, S. E.; THOMPSON, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J. K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **J. Vet. Diag. Invest.** v. 9, p. 387-394, 1997.

BABIUK, L. A.; LITTLE-VAN, S.V.D.; TIKOO, S. K.; Infectious bovine rhinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis and infectious pustular balanopostite. In: Infectious Diseases of Livestock. Ed. 2 nd. **Oxford University press: South Africa**. Cap. 79, p. 875-886, 2004.

BAGUST, T. J; CLARCK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **J. Comp. Pathol.** v.82, p. 375-374, 1972.

BELKNAP, E.; COLLINS, J.; AVERS, V.; SCHULTHEISS, P. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvírus type 1.3. **Vet. Pathol.**, v. 31, p. 358-365, 1994.

BELTRÃO, N.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M. ROEHE, P. M.; IRIGOYEN, L. F. Acute infection and neurological disease by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5): rabbits as experimental model. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.20, p. 144-150, 2000.

The Big Picture Book of Viruses: Herpesviridae Disponível em: http://www.virology.net/Big_Virology. Acesso 10.10.2007.

BLANCO-VIEIRA, F. J.; CARRILLO, B. J.; WEBER, E. L. BARDON, J. C.; COMBESSIES, G. M.; CORDEVIOLA, J. M.; NOSEDA, R.; SONI, C. A.; SCHUDEL, A. A. Casuística neuropatológica. estudio microscópico de los casos clínicos remitidos al programa de vigilancia de BSE em Argentina, durante el período comprendido entre 1994-1996. **Rev. Med. Vet.** , v. 79, p. 226-230, 1998.

BRAKE, F.; STUDDERT, M. J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesvirus including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Aust. Vet. J.**, v. 62, p.331-334, 1985.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ARNS, C. W. Bio-Safety Technology in Production of Bovine Herpesvirus Type 5 (BoHV-5) Using an Alternative Serum-Free Medium. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, v.3, p.125-130, 2007.

CARNE BOVINA: estudo do mercado mundial. Disponível em: <http://agrocarnes.com.br>. Acesso em: 10 out. 2007

CARON, .L. E. F.; FLORES, C.F.C.; SCHERER, R.; WEIBLEN, I. E.; IRIGOVEN, P. M.; ROEHE, A.; ODEON, J. H. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Vet. Microbiol.**, v. 4, p. 285-295, 2002.

CARRILLO, B. Encefalitis em bovinos por herpesvírus. **Vet. Med.**, (Bs As). v. 63, p. 372-376, 1982.

CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHUTHEISS, P. C.; AMES, A.D.; DAHME, E.; COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **J. Vet. Diagn. Investig.**, v. 11, p. 134-139, 1999.

CHASE, C. C. L.; CARTEN-ALLEN, K. LOHFF, C.; LETCHWORTH G.J. Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1(BHV-1) glycoprotein IV resist infection by BHV-1, herpes simplex virus and pseudorabies virus. **J. Virol.**, v. 64, p. 4866-4872, 1990.

CHEUNG, A. K. Investigation of pseudorabies vírus DNA and RNA in trigeminal ganglia and tonsil tissue of latently infected swine. **Am. J. Vet. Res.**, v.56, p.45-50, 1995.

CHOWDHURY, S. I. Molecular basis of antigenic variation between the glicoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1(BHV-1) and neurovirulent (BHV-5). **Virology.**, v. 213, p. 558-568, 1995.

CHOWDHURY, S. I.; LEE, B.J.; OZKUL, A.; WEISS, M.L. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **J. Virol.**, v. 74, p. 2094-2106, 2000.

CHOWDHURY, S. I.; ONDERCI, M.; BHATTACHARJEE, P.S.; AL-MUBARAK, A.; WEISS, M.L.; ZHOU, Y. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) US9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. **J. Virol.**, v. 76, p.3839-3851, 2002.

CHOWDHURY, S. I.; LEE, B. J.; MOSIER, D.; SUR, J. H.; OSORIO, F. A.; KENNEDY, G.; WEISS, M. L. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. **J. Comp. Pathol.**, v. 117, p. 295-310, 1997.

COLODEL M. E., NAKAZATO L., WEIBLEN R., MELLO R. M., SILVA R. P., SOUZA M. A., OLIVEIRA J. A. & CARON L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado do Mato Grosso, Brasil. **Ciênc. Rural**, v.32, p. 293-298, 2002.

COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p12, 1999.

CROEN, K. D. Latency of human herpesvirus. **Annu. Rev. Med.**, v. 42, p. 61-67, 1991.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of

Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p.315-324, 2002.

DASIKA, G. K.; LETCHWORTH, G. J. Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 glycoprotein D at the cell surface during virus entry. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1041-1049, 2000.

DIEL D. G.; FONSECA E. T.; SOUZA S. F.; MAZZANTI A.; BAUERMANN F.; WEIBLEN R.; FLORES E. F. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir os sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesqui. Vet. Bras.**,v. 25, p.164-170, 2005.

D' OFFAY, J. M.; ELY, R. W.; BALDWIN, C. A. WHITENACK, D. L.; STAIR, E. L. & COLLINS, J. K.; Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: vírus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed brain tissue. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, p. 247-251, 1995.

ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácea por Herpes vírus bovino-5 (BHV-5): distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesqui. Vet. Bras.**, 24 (3): 123-131, 2004..

ELY, R. W.; D'OFFAY, J. M.; RUEFER, A. H.; CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephlitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 8, p. 487-492,1996.

ENGELHARDT, T.; KEIL, G. M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. **Virology**. v. 225, p. 126-135, 1996.

ENGELS, M. C.; GIULIANI, W. P.; BECK, P.; LOEPF, T. M.; WYLER, R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Res.**, v. 6, p. 57-73, 1986.

ENQUIST, L. W.; TOMISHIMA, M. J.; GROSS, S.; SMITH, G. A. Directional spread of an α -herpesvirus in the nervous system. **Vet. Microbiol.**, v. 86, p. 5-16, 2002.

EUGSTER, A. K.; ANGULO, A. B.; JONES, L. P. Herpesvirus encephalitis in range calves. *Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Lab. Diagn.*, v. 17. p. 267-281. 1975.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. The Eighth Report. San Diego, Academic Press. 2004. p. 1162.

FEHLER, F.; HERRMANN, J. M.; SAALMULLER, A.; METTENLEITER, T. C.; KEIL, G. M. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescue a conditionally lethal viral mutant. **J. Virol.**, v. 66, p. 831-839, 1992.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Virologia Veterinaria**. Zaragoza: Ed. Acribia., 1992. 349-354p.

FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T. C.. Detection of bovine Herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR:

a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis.

J. Virol. Meth., v. 146, p.335-340, 2007.

FLORES, E.; SILVA, A.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5) (avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais. In: Simposio Internacional de Herpesvirus Bovino e Virus da Diarréia Viral Bovina.1998. Santa Maria. Anais... Santa Maria: UFSM, 1998. p. 127-137.

FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: Isolation and characterization of the causal agent. **Aust. Vet. J.**, v. 38. p.216-221. 1962.

FULLER, A. O.; LEE, W. C. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 8, p. 845-853, 1992.

GIAVEDONI, L. D.; RUIZ, M.; FIJTMAN, N.; SCHUDEL, A. A.; RODRÍGUEZ, M. Rapid diagnosis of bovine herpesvírus encephalitis: comparison of nucleic acid hybridization and immunoperoxidase methods using clinical samples. **J. Vet. Med.**, v. 35, p. 280-285, 1988.

GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; COSTA, E. A.; LOBATO, Z. I. P.; MENDES, L. C. N.; BORGES, A. S.; LEITE, R. C.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v.54, n.2, p.217-220, 2002.

GRANZOW, H.; WEILAND, F.; JÖNS, A.; KLUPP, B. G.; KARGER, A.; METTENLEITER, T. C. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. **J. Virol.**, v. 71, p.2072-2082, 1997.

HALFEN D.C.; VIDOR T. Infecções por Herpesvírus bovino-1 e Herpesvírus bovino-5. p. 97-107. In: RIET-CORREA E., SCHILD A.L., MENDEZ M.C., LEMOS R.R.A (ed.) **Doença de ruminantes e eqüinos**. v. 2. ed. **São Paulo: Varela**, 2000. p. 97-107.

HOURIUCHI, M.; YAMAZAKIN, N.; FURUOKA, H.; MATSUI, T.; NAKAGAWA, M.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M.; Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. **J. Vet. Med. Sci.** v. 57. p. 577-580, 1995.

HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gI,gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v. 28, p. 187-196, 2005.

KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A.; RUULS, R. C.; KEIL, G.M.; THIRY, E.; PASTORE, A. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC,gG,gI,gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**. v. 16, p.802-809, 1998.

LEE, B. J.; WEISS, M. L.; MOSIER, D.; CHOWDHURURY, S. I. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **J. Neurovirol.**, v. 5, p. 474-484, 1999.

LIANG, X.; BABIUK, L. A.; VAN DRUNEL LITTEL-VAN DEN HURK, S.; FITZ-PATRICK, D. R.; ZAMB, T. J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI,gIII and gIV. **J. Virol.**, v. 65, p. 1124-1132, 1991.

LOVATO, L. T. BHV-1 E BHV-5, isolamentos sorologia no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. Anais..., Santa Maria: UFSM, 1998, p.97-101.

MERTEN O.W. Development of serum-free media for cell growth production of viruses/viral vaccines-safety issues of animal productus used in serum-free media. In HENDRIKSEN C. D.; SESARDIC K. CUSSLER. Ed. Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccines and hormones. **Dev. Biol.Basel.Karger.**, v.111; p. 233-257; 2002.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Arch. Virol.**, v. 87, p. 205-217, 1986.

MEYER, G.; BARE, O.; THIRY, E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **J. Gen. Virol.** v. 80, p. 2849-2859, 1999.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, E.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus type 1 and 5. **Arch. Virol.** v. 146, p. 633-652, 2001.

OKIJIM, K. Development of *in situ* nest PCR and comparison of five molecular biological diagnostic methods for the detection of intracellular viral DNAs in paraffin sections. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, p. 231-235, 2003.

PEETERS, B.; DE WIND, N.; HOOISMA, M.; WAGENAAR, F.; GIELKENS, A.; MOORMAN, R. Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII involved in membrane fusion. **J. Virol.**, v. 66, p. 894-905, 1992.

PEREZ, S. E.; BRETSCHNEIDER, M. R.; LEUNDA, F. A.; OSORIO, E. A.; FLORES, E. F.; ODEON, A. C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Vet. Pathol.**, v. 39, p. 437-444, 2002.

PESHEV, R.; CHRISTENSEN, L.; CHRISTOVA, L. Comparative molecular epidemiological investigation on different bovine herpes viruses. **Comp. Immunol Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21, p. 247-255, 1998.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; CERQUEIRA, V. D.; BRITO, M. F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e poliencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesqui. Vet. Bras.** v. 26, p.44-46, 2006.

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causado por herpesvírus bovino-1. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.9, p.13-16, 1989.

RISSI, D. R.; OLIVEIRA, F. N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R. A. A.; BARROS, C. S. L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesqui. Vet. Bras.** v. 26, p. 123-132, 2006.

ROEHE, P. M.; TEXEIRA, M. B.; ESTEVES, P. A. et al. Situação do BoHV-1 e BHV-5 no Brasil. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, **Santa Maria. Anais...** Santa Maria: UFSM, p.89-96, 1998.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOF, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSH, L. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Vet. Rec.**, v. 13, p.586-588, 2000.

ROIZMAN, B. The Family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, v. 123, p.432-445. 1992.

ROS, C.; BELAK, S. studies of genetic relationships between bovine, caprine, corvine and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1247-1253, 1999.

SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSORIO, A. L. A. R. Meningoencefalite causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.18, p. 76-83, 1998.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Vet. Microbiol.**, v. 53. p.17-19. 1996.

SILVA, A. D.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; ESTEVES, P. A.; HÜBNER, S. O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A. P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P. M. Vaccination with a gE- negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine.**, v. 24, p. 3313 – 320, 2006.

SILVA, A. M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; SUR, H. J.; OSORIO, F. A.; FLORES, E.F. Experimental infection of sheep with bovine herpesvírus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. **Vet. Microbiol.**, v. 66, p.89-99, 1999.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; LORETO, E.L.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from brain of cattle with neurological disease. **Virus Res.**, v. 129, p. 191-199, 2007.

SILVA, T. C.; ROEHE, P. M.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (BHV-1). **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, v. 49, p. 513-22, 1996.

SODEIK, B.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex vírus 1 capsids to the nucleus. **J. Cell Biol.**, v. 136, p. 1007-1021, 1997.

SOUZA, V. F.; MELO, S. V.; ESTEVES, P. A.; SCHMIDT, C. S.; GONÇALVES, D. A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T. C.; ALMEIDA, R. S.; VICENTINI, F.; FRANCO, A. C.; OLIVEIRA, E. A.; SPILKI, F. R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; LEMOS, R. A.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M.; ROEHE, P. M. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). **Pesqui. Vet. Bras.** v. 18, p. 22 – 23, 2002.

SPEAR, P. G.; SHIEH, M. T.; HEROLD, B. C.; WUDUNN, D.; KOSHY, T. I. Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. In. Heparin and Related Polysaccharides. **New York:Plenum**, p. 341-353, 1992.

SPILKI, F.R.; SILVA, A.D.; HÜBNER, S.O.; ESTEVES, P.A.; FRANCO, A. C.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P. M. Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 50, p. 1026-247, 2004

SPILKI, R. R.; FRANCO, A. C.; TEXEIRA, M. B.; ESTEVES, P. A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R. A.; ROEHE, P. M. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesqui. Vet. Bras.** v. 23, p. 1-4; 2003.

SPIILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; FRANCO, A. C.; LIMA, M.; HOLZ, C. L.; BATISTA, H. B. R.; DRIEMEIER, D.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P. M. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipo 1 e 5 em coelhos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 22, p. 58-63, 2002.

STEINER, I.; KENNEDY, P. G. Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. **J. Neurovirol.**, v. 1, p. 19-29, 1995.

STUDDERT, M. J., Bovine encephalitis herpesvirus. **Vet. Rec.** v. 125, p.584. 1989.

TUNER, A.; BRUUN, B.; MINSON, T.; BROWNE, H. Glycoproteins gB, gD and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. **J. Virol.**, v. 72, p. 873-875, 1998.

VALOR da produção agropecuária deve crescer 8,6% em 2007. Disponível em: <http://www.ambienteemfoco.com.br>. Acesso em: 10 out. 2007

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R., MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvírus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

ZUCKERMANN, F.; METTENLEITER, T.C.; SSHREURS, C.; SUGG, N.; BEMPORAT, T. Complex between glycoproteins gI and Gp63 pseudorabies virus: its effects on virus replication. **J. Virol.**, p.4622-4626, 1988.

WILD, P.; SCHRANER, E. M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **J. Virol.**, v. 72. p. 9561-9566. 1998.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

Análise histopatológica de encéfalo de bovinos naturalmente infectados por *Herpesvírus* bovino tipo 5 e diagnosticados no isolamento em cultura de células e pela técnica de PCR.

Heitor Flávio Ferrari, Maria Cecília Rui Luvizotto e Tereza Cristina Cardoso.

ABSTRACT – Meningoencephalitis occasioned by Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) has been described as localized in some regions inside Brazil, like Rio Grande do Sul State and, also characterized as an endemic encephalitis disorder. However, the often description of its occurrence in São Paulo in Mato Grosso has being notice. The aim of this work was to first characterize the histologic lesions obtained from bovine brains suspected of suffering of neurological disorders. For this purpose, 20 brains were collected from acute cases of the disease, naturally infected by BoHV-5, confirmed by virus isolation and PCR. The most observed lesions were described as being: inflammatory cells, specially infiltrated lymphocytes (80%), necrosis (20%), and less focal gliosis and hemorrhage. In spite of these lesions being characterized as no-specific, in all cases the BoHV-5 was recovered by cell infection and detected by PCR. Finally, the gross lesions and microscopic damage of the brain structure were sufficient for the virus infection suspicion, however it is necessary the complementary techniques to confirm the diagnosis in most of the cases.

INDEX TERMS: Meningoencephalitis, cortical cerebral necrosis, acute infection, bovine herpesvirus type 5, cattle

RESUMO.- A meningoencefalite não supurativa causada pelo Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) ocorre de forma endêmica em regiões do Brasil, principalmente no Sul do país. No entanto, os relatos desta doença são escassos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. O presente trabalho objetivou analisar as alterações histológicas desenvolvidas na infecção aguda pelo BoHV-5, no encéfalo de 20 animais naturalmente infectados pelo vírus, realizando o isolamento viral em células MDBK e técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). As lesões microscópicas observadas em 80% dos animais foram de meningoencefalite não supurativa, com reação inflamatória de intensidade variável e em 20% dos casos as alterações não foram compatíveis com infecção viral. Em todas as amostras foi

possível fazer o isolamento viral e a amplificação fragmento de 159 pb, referente ao DNA do *herpesvírus*, após a técnica da PCR. A análise histopatológica mostrou, na totalidade, alterações decorrentes da enfermidade e revelou que dependendo do tempo de progressão dessa infecção pode não haver o desenvolvimento de alterações histológicas. As técnicas empregadas foram capazes de detectar a presença do BoHV-5, além de permitir a diferenciação de outras enfermidades neurológicas de importância econômica para o Brasil como Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE).

·
TERMOS DE INDEXAÇÃO: Meningoencefalite, necrose cortico cerebral, infecção aguda, herpesvirus bovino- 5, bovinos.

INTRODUÇÃO

O *Herpesvírus* bovino tipo-5 (BoHV-5) é o agente causal da meningoencefalite necrótica em animais jovens e leva a significantes perdas econômicas na bovinocultura de corte (Fauquet et. al. 2004, Roizman 1992). O agente etiológico, membro da família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, apresenta distribuição geográfica limitada, alta incidência como vírus responsável por causar doenças neurológicas nos países da América do Sul, principalmente Brasil e Argentina, porém com ocorrência esporádica em outras partes do mundo (Peshev et al. 1998, Schwyzer & Ackermann 1996.)

No Brasil a meningoencefalite por BoHV-5 foi descrita no Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al. 1989, Elias et al. 2004), Mato Grosso do Sul e São Paulo (Salvador et al. 1998), Paraná (Halfen & Vidor 2000), Mato Grosso (Colodel et al. 2002), Rio de Janeiro e Minas Gerais (Gomes et al. 2002) e Pará (Riet-Correa et al. 2006). Os surtos têm sido observados em bezerros de até 3 meses (Riet-Correa et al. 1989, Elias et al. 2004) e bovinos adultos de até 6 anos (Salvador et al. 1998, Elias et al. 2004).

Os sinais clínicos da doença decorrem do comprometimento encefálico, caracterizado por tremores, nistagmo, convulsão, bruxismo, andar em círculos, ataxia, pitalismo, movimentos de pedalagem, paralisia e morte (Meyer et al. 2001, Perez et al. 2002).

O BoHV-5 e BoHV-1 são difíceis de serem diferenciados com o emprego de métodos sorológicos e virológicos, devido a homologia genética de

aproximadamente 85% entre eles. Eles são neurotrópicos e podem ser diferenciados na sua habilidade de causar encefalite (Chowdhury 1995, Ashbaugh et al. 1997), sendo que o BoHV-1 pode ser ocasionalmente neuroinvasivo e com potencial de replicar-se neste local, mas raramente causa encefalites e tem se mantido restrito a casos de doenças respiratórias e genitais. No entanto, BoHV-5 tem neurotropismo marcante, replica-se no sistema nervoso central (SNC) e está incriminado como agente etiológico na neuropatogênese de meningoencefalite não supurativa, conduzindo frequentemente o animal à morte (Studdert, 1989; Belknap et al. 1994, Flores et al. 1998).

A via de infecção do SNC em bovinos pelo BoHV-5 tem sido estudada, contudo os trabalhos não são conclusivos a este respeito (Belknap et al. 1994, Flores et al. 1998). Verificou-se que a via olfatória foi a principal rota de infecção do vírus para o encéfalo em modelos experimentais conduzidos em coelhos (Lee et al. 1999) e bovinos (Bagust & Clark 1972). Estudos sugerem que o par do nervo craniano trigêmeo é considerado uma permanente fonte de infecção viral e a alteração do estado de latência contribui para a disseminação do vírus por todo o encéfalo (Chowdhury et al. 1997).

As alterações macroscópicas no SNC nem sempre ocorrem na meningoencefalite por BoHV-5, mas quando presentes são caracterizadas por hiperemia e congestão dos vasos da leptomeninge, tumefação das porções rostrais do telencéfalo, com achatamento das circunvoluções dos lóbulos frontais e coloração amarelada ou acastanhada da substância cinzenta do córtex cerebral. Nota-se, ainda, cavitações nos núcleos da base e da cápsula interna, hemorragias multifocais na substância branca, cinzenta e nas meninges, e áreas de malácia na substância cinzenta dos núcleos basais e do tálamo (Elias et al. 2004, Rissi et al. 2006).

A histopatologia dos fragmentos de encéfalo mostra como alteração principal a meningoencefalite não supurativa associada a focos de malácia, constituídas por manguitos perivasculares, compostos particularmente por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos. Áreas de malácia exibem vacuolização da neurópila, neurônios eosinofílicos (necrose neuronal), satelitose, neuronofagia e células de Gitter. Ocorrem também, alterações circulatórias (congestão, hemorragia e edema) distribuídas tanto na substância branca quanto na cinzenta ou em ambas, hiperplasia do endotélio vascular, infiltração difusa de neutrófilos na neurópila e

meningite não supurativa também são observados (Elias et al. 2004, Riet-Correa et al. 2006, Rissi et al. 2006, Salvador et al. 1998).

O presente trabalho objetivou estudar a etiologia de casos de meningoencefalite não supurativa, utilizando o isolamento viral em cultivo celular e amplificação de DNA pela técnica da PCR, em amostras que foram diagnosticados pela microscopia, bem como avaliar as alterações histopatológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Histórico das Amostras. O presente estudo constou de 20 amostras de encéfalos de bovinos com sintomatologia neurológica ou alteração macroscópica, durante os anos entre 2004 e 2006, da região noroeste do estado de São Paulo e do estado de Mato Grosso do Sul (Tabela 1). As amostras foram coletadas durante a necropsia e exame macroscópico e entre as enviadas por Médicos Veterinários autônomos para o Serviço de Patologia Veterinária UNESP- Araçatuba. Os fragmentos coletados, divididos em duas partes, uma correspondente ao córtex frontal, hipocampo e cerebelo foram fixados em formol tamponado a 10% para o exame de histopatologia de rotina e coloração de hematoxilina e eosina (HE) e a outra parte coletada em tubos de polipropileno e conservada a temperatura de – 80°C para posterior realização do isolamento viral e PCR. Na análise histopatológica, as lesões foram classificadas em inflamatórias (manguitos e meningite), degenerativas (malácia, necrose neuronal, neuronofagia e corpúsculo de inclusão), e circulatórias (edema, hemorragia), sendo avaliadas segundo o critério de escore: ausente, + discreta, ++ moderada,+++ acentuada (Salvador et al 1998 e Rissi et al., 2006).

As amostras congeladas foram submetidas ao isolamento em cultivo celular e à técnica da PCR, para a pesquisa de provável envolvimento viral. Os fragmentos do encéfalo selecionados foram: bulbo olfatório, córtex anterior e dorso-lateral, nervo trigêmio e ponte, locais de maior detecção do vírus no estudo experimental realizado por Vogel et al., (2003).

Cultivo Celular. Preparou-se suspensões de todos os fragmentos de SNC de cada animal no meio essencial mínimo Eagle's (MEM), seguido do isolamento em células MDBK (Madin-Darby bovine cell line ATCC-CCL-22), cultivando as células no meio advanced RPMI 1640 (Gibco-BRL cat # 12633), sem soro fetal bovino e/ou proteína animal. A estirpe viral do BoHV-5, representativa do controle positivo para o cultivo, foi gentilmente doada pelo Instituto Biológico, São Paulo, Brasil. O uso de

células não infectadas serviu como controle negativo do isolamento viral, sendo que os resultados positivos foram determinados pelo efeito citopático, resultante da infecção viral (Cardoso et al, 2007).

Extração do DNA e PCR. O processo de extração de DNA foi realizado a partir 200 µl das amostras de encéfalo em suspensão e do cultivo celular, utilizando kit de extração Easy-DNA™(Invitrogen cat # 45-0424) (Ferrari et al., 2007). O DNA foi precipitado após a incubação overnight -86 °C, com 1 ml de etanol à 100% e centrifugação a 16,000 x g por 20 min no dia seguinte. O “pellet” obtido após processamento em 1ml de etanol à 70%, seco e re-suspendido em 15 µl de água DEPEC e estocado -86 °C, até o uso.

A técnica PCR foi realizada segundo Claus et al. (2005) com algumas modificações (Ferrari et al, 2007). Os “primers” utilizados foram B5 específico para BoHV-5 (5' – CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' NT 322-339), B1 específico para BoHV-1(5'- CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC-3' NT 185-204) e primer consensu denominado Bcon (5'- AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' NT 519-538), amplificando 159 pb do BoHV-5 e 359 pb do BoHV-1 (genes da glicoproteína C). O gene da beta actina foi usado como controle interno da técnica da PCR (GenBank Access number LOC 206456) resultando na amplificação de 120bp. Realizou-se a reação de PCR em solução contendo aproximadamente 200 ng/µl de DNA extraído, 12.5 µl de PCR 2x reaction mix, contendo 20 pmol de cada primer, 1.6 mM de MgCl₂ e 2.5 unidades/25 µl de solução final (Invitrogen cat # 11904-01). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) no tampão TBE (pH 8.4) e visualizado sob luz ultra-violeta. Os géis foram documentados com câmera digital Kodak DC290.

RESULTADOS

Sinais clínicos e achados necroscópicos

Os sinais clínicos e macroscópicos foram observados em 55% dos bovinos que apresentaram alterações neurológicas como, ataxia, incoordenação motora, bruxismo, opstótono, paralisia flácida dos membros, decúbito esternal, secreção nasal e morte (Tabela 1). A análise macroscópica dos encéfalos desses animais exibiu turgidez vascular à superfície externa e de corte, hemorragia difusa, áreas de malácia (Figura 1 e 2) de coloração amarelada, giros de aspecto plano e de consistência amolecida (Figura 3). Ao corte do encéfalo a córtex cerebral apresentou congestão, microhemorrágias, áreas extensa de necrose de coloração amarelo-

acinzentada, localizadas na substância cinzenta (Figura 4) e em um único espécime pôde se observar microcavitações.

Nos bovinos 227/05, 28/05, 138/04, 175/04 e 427/05 o histórico descrito não apresentava qualquer tipo de sintomatologia neurológica, mas havia relatos de morte súbita, sendo selecionados por apresentarem congestão e hemorragia difusa. Os demais animais identificados pelos números 17/05, 19/04, 137/06 e 282/05 desenvolveram sinais clínicos de comprometimento neurológicos, sem alterações macroscópicas, mostrando algumas vezes congestão vascular discreta.

Histopatologia

A análise histopatológica de 80% dos fragmentos de SNC exibiu reação inflamatória diagnosticada como meningoencefalite não supurativa, caracterizada por manguito perivascular (Figura 5), infiltrado inflamatório na meninge (Figura 6), constituído por células linfohistiocitárias, dispostas em camadas, com intensidade variável. Nas amostras 37/05, 41/05, 24/05, 15/05, 175/05 e 329/05 foi possível observar a presença de plasmócitos e raros neutrófilos na constituição dos manguitos e infiltrados na leptomeninge (Tabela 2).

As alterações degenerativas foram observadas em 90% das amostras, sendo compostas por necrose neuronal, neuronofagia (Figura 7), áreas difusas de malacia no córtex frontal, de extensões variáveis, localizadas na substância cinzenta, estendendo-se para a branca, caracterizadas pela presença de infiltrados extensos de macrófagos e linfócitos, associados, na maioria das vezes, a células Gitter e vacuolização da neurópila. Corpúsculos de inclusão viral intranuclear acidofílicos foram observados nos astrócitos e neurônios (55%), sendo mais freqüentes nos primeiros e aparentemente sem qualquer relação com a intensidade da reação inflamatória tecidual (Figura 8).

As lesões circulatórias foram principalmente de hemorragia, apresentada em todos os fragmentos analisados, com intensidade variável para cada animal, formando acúmulos de sangue na meninge ou de forma discreta pela presença de hemácias no espaço de Virchow Robbin. Notou-se, ainda, alterações endoteliais como tumefação das células, vasculite e necrose. Nas secções histológicas 17/05, 19/04, 137/06 e 282/05 observou-se como alterações mais importantes congestão, hemorragia e edema, associadas algumas vezes a necrose neuronal.

Na região de bulbo olfatório havia gliose difusa, satelitose, necrose neuronal, neuronofagia, manguitos perivasculares, congestão, hemorragia e edema acentuados (Figura 9), identificados em 40% das amostras que apresentaram este corte histológico. Em apenas uma amostra do bulbo olfatório apresentou corpúsculo de inclusão intranuclear acidofílico, de forma acentuada, nos astrócito e em neurônios.

As regiões de cerebelo e hipocampo exibiram as mesmas lesões já descritas para o córtex frontal, mas de forma mais discreta e na maioria das vezes ausente.

Cultivo Celular

As 20 amostras que foram submetidas ao isolamento viral em cultivo celular apresentaram diagnóstico negativo para o vírus rábico. O efeito citopático (ECP) típico dos BoHV-5 foi observado após a terceira passagem nas células MDBK, para cada amostra (Tabela 2). O ECP mostrou áreas focais de morte celular, ausência de células em diversas áreas do tapete, formação de células multinucleadas (sincicial), com citoplasma abundante e formação de filamentos (Figura 10).

PCR

Os resultados da técnica da PCR (Tabela 2) a partir da suspensão de encéfalo e do sobrenadante das células MDBK, mostrou amplificação do fragmento de DNA do BoHV-5 (159 pb), referente a região conservada do gene da glicoproteína C, nas 20 amostras estudadas (Figura 11). A amplificação da glicoproteína C do BoHV-1 (Figura 12), resultou em resultado negativo para todas as amostras.

DISCUSSÃO

A infecção por BoHV-5 é responsável pela meningoencefalite não supurativa, enfermidade presente em certas regiões do país como no Rio Grande do Sul, ocorrendo principalmente em surtos, com morbidade variável e letalidade alta; embora em alguns casos os animais possam sobreviver (Elias et al. 2004). No entanto, em outras regiões do país as enfermidades, que acometem o SNC, também ocorram, e a pesquisa do agente etiológico muitas vezes não seja determinada, destacando-se o estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Até o presente momento existem apenas dois trabalhos que confirmam a presença do vírus nestes estados (Salvador et al. 1998, Gomes et al. 2002), sendo necessário exaltar a importância deste vírus no diagnóstico diferencial das doenças encefálicas de importância econômica como BSE e a raiva.

Os sintomas neurológicos apresentados pelos bovinos avaliados neste estudo mostraram evolução progressiva e culminam com o óbito (Salvador et al. 1998, Riet-Correa et al. 2006). A ausência de sinais clínicos com evolução rápida para a morte (20% dos casos), sugere ser a forma aguda decorrente da estirpe viral envolvida, provavelmente diferente dos surtos referidos em outras regiões (Salvador et al. 1998, Elias et al. 2004, Diel et al. 2005, Riet-Correa et al. 2006, Rissi et al. 2006). A evolução aguda decorre do estresse a que estes animais foram submetidos e imunossupressão, criando condições apropriadas para a reativação viral.

As alterações macroscópicas no SNC, apesar de comum a outras encefalopatias, foram caracterizadas por congestão, hemorragia dos vasos da pia-aracnóide, edema, tumefação dos giros das porções rostrais e achatamento das circunvoluções, associadas a coloração amarelada, malácia e em apenas um encéfalo cavitações no córtex cerebral, lesões similares foram referidas por Riet-Correa et al. (2006) e Rissi et al. (2006). Alterações vasculares foram as únicas observadas em alguns encéfalos (227/05, 28/05, 138/04 e 427/05), cuja análise histológica mostrou lesões compatíveis com a infecção viral, mas segundo Salvador et al (1998) estas alterações circulatórias macroscópicas foram consideradas não específicas.

Nos 20 casos com e sem sintomatologia e com ou sem o desenvolvimento de alterações macroscópicas no encéfalo, o exame microscópico foi decisivo para suspeitar de infecção viral por BoHV-5. Como se sabe existem outras enfermidades que acometem o SNC de bovinos como a raiva, listeriose, poliencfalomalacia e BSE (Gomes et al. 2002). O diagnóstico da enfermidade baseia-se nos achados clínico-epidemiológicos, na necropsia, histopatologia e confirmada por isolamento viral (Salvador et al. 1998) e técnica de PCR (Ferrari et al., 2007).

Os fragmentos de encéfalo coletados para a realização da histopatologia e posterior análise das lesões foram do córtex frontal, hipocampo e cerebelo. De acordo com estudos, comparando diferentes regiões do cérebro com relação às lesões histológicas e à presença do vírus, constatou-se que existe uma tendência das alterações e da localização viral estarem concentradas no córtex frontal (Elias et al. 2004, Vogel et al. 2003), o que permitiu a utilização das amostras de para o desenvolvimento da pesquisa.

A histopatologia exibiu reação inflamatória de intensidade variável, caracterizada na maioria das vezes por densos acúmulos na meninge e perivascular de linfócitos e macrófagos (Ely et al. 1996, Perez et al. 2003, Riet-Correa et al. 2006). As áreas de malácia cortical foram classificadas como de intensidade moderada. Segundo Elias et al. (2004) esta alteração depende principalmente do tempo de evolução da enfermidade. A malácia moderada pode ser decorrente do curso agudo da infecção, não havendo tempo hábil para o desenvolvimento de forma acentuada.

Além dessas alterações histológicas foram observadas lesões importantes constituídas por satellitose, neuronofagia, necrose neuronal, congestão, hemorragia, edema, tumefação das células endoteliais, vasculite e malacia da substância cinzenta do córtex cerebral, referenciadas durante surtos desta doença (Bagust & Clarck 1972, Riet-Correa et al. 1989, Ely et al. 1996, Salvador et al. 1998, Colodel et al. 2002, Perez et al. 2003, Elias et al. 2004, Rissi et al. 2006, Riet-Correa et al. 2006).

Quatro amostras (17/05,19/04,137/06 e 282/05) avaliadas com relação à presença de alterações histopatológicas mostraram congestão, hemorragia, edema, necrose neuronal, lesões que podem ser decorrentes de outras patologias, sejam elas com comprometimento neurológico ou sistêmico. Esta ausência de lesões significativas mostra uma forma aguda da infecção, com desenvolvimento de sintomatologia clínica, mas sem lesões macroscópicas e microscópicas, cujo agente etiológico foi determinado por meio da PCR após amplificação do DNA viral.

A análise de 40% dos bulbos olfatórios mostrou alterações semelhantes às daquelas do córtex cerebral, com presença de corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílico, o que pode sugerir a via de acesso do vírus para o acometimento e a disseminação por todo encéfalo. Os resultados de Diel et al.(2005) demonstraram que tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o SNC de coelhos, após inoculação experimental.

Neste estudo, o isolamento do vírus em cultivo celular foi possível para todas as amostras com o desenvolvimento de ECP, embora alguns autores afirmem não terem conseguido isolar o vírus de animais com sintomatologia neurológica e diagnóstico histopatológico de infecção por BoHV-5 (Cascio et al. 1999, Carrillo 1982). As concentrações dos títulos virais avaliados por Belknap et al. (1994) apresentaram variação para cada região do encéfalo, o que sugere que dependendo da área utilizada para o isolamento viral, esta pode não apresentar a concentração apropriada de vírus para o desenvolvimento do ECP.

Os resultados da PCR foram positivo para todos os fragmentos de encéfalos testados, permitindo determinar a etiologia das alterações histológicas diagnosticadas como meningoencefalite não supurativa, como sendo decorrente do BoHV-5. A utilização da PCR se faz necessária, pois as alterações histopatológicas são muito características das observadas nos casos de raiva (Spilki et al. 2003) e o isolamento viral utilizando soro fetal bovino pode conter contaminantes heterogêneos tais como fungo, bactéria, vírus, ácido nucléico e príons, como da BSE que desenvolve ECP na cultura de células (Merten 2002, Cardoso et al. 2005).

As lesões histopatológicas diagnosticadas como meningoencefalite não supurativa ao longo dos anos de 2004 a 2006, levaram a suspeitar de infecção viral por BoHV-5 e este agente etiológico foi determinado por isolamento viral e pela técnica de PCR. O estudo, macro e microscópico de quatro encéfalos, revelaram que nem sempre é possível sugerir se tratar desta infecção viral pela análise histológica, devido a ausência de alterações sugestivas, em decorrência da evolução aguda da doença, culminando com a morte. Desta forma se faz necessário a utilização de testes mais sensíveis para a realização do diagnóstico e determinação do patógeno envolvido na encefalite.

Os casos que apresentaram sintomatologia de morte súbita sem o histórico de alteração neurológica mostraram durante a necropsia congestão, hemorragia e edema do SNC e a microscopia confirmou as alterações compatíveis com o diagnóstico de meningoencefalite não supurativa. Portanto quadros de morte súbita pode ter como etiologia encefalite de origem viral, como o BoHV-5

Referências

- Ashbaugh S. E., Thompson K. E., Belknap E. B., Schultheiss P. C., Chowdhury S., Collins J. K. 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 387-394.
- Bagust T. J.; Clarck L. (1972) Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.* v.82, p. 375-374, 1972.
- Belknap E.; Collins J.; Avers V.; Schulthesis P. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Pathol.* 31: 358-365.
- Cascio K. E., Belknap E. B., Schutheiss P. C., Ames A.D., Dahme E., Collins J.K.1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Investig.* 11:134-139.
- Cardoso T.C., Ferrari, H. F., Luvizotto, M. C. R., Arns, C. W. 2007. Bio-Safety Technology in Production of Bovine Herpesvirus Type 5 (BoHV-5) Using an Alternative Serum-Free Medium. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 3(3): 125-130.
- Cardoso T.C., Queros-Silva L.H., Silva L.H., Albas A., Pardo P.E., Tanaka A.H., Cossy L.B., Perri S.H.V. 2006. Chicken related (CER) cell line for quantification of rabies neutralizing antibody by fluorescent focus inhibition test. *Biologicals.* 34:29-32.

- Cardoso T.C., Texeira M.C.B., Fachin N., Camargo T.L., Gomes D.E., Junior A.C.O, Anselmo B. 2005. Evaluation of serum and animal-free media for the production of infectious bronchitis virus (M41) strain in a continuous cell line. *Altex*. 3:152-156.
- Carrillo B. 1982. Encefalitis en bovinos por herpesvirus. *Rev. Med. (Bs As)*. 63:372-376.
- Chowdhury S. I. 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1(BHV-1) and neurovirulent (BHV-5). *Virology*. 213: 558-568.
- Chowdhury S. I.; Lee B. J.; Mosier D.; Sur J. H.; Osorio F. A.; Kennedy G.; Weiss M. L. 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol*. 117(4): 295-310.
- Claus M. P., Alfieri A. F., Flojeras-Flatschart A. V., Wosiacki S. R., Médici K. C., Alfieri A. A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods*., 128: 183-188.
- Colodel M. E., Nakazato L., Weiblen R., Mello R. M., Silva R. P., Souza M. A., Oliveira J. A. & Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado do Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 32 (2):293-298.
- Diel D. G., Fonseca E. T., Souza S. F., Mazzanti A., Bauermann F., Weiblen R., Flores E. F. 2005. O Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir os sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesq. Vet. Bras*. 25(3):164-170.
- Elias F., Schild A.L. & Riet-Correa F. 2004. Meningoencefalite e encefalomalácea por Herpes vírus bovino-5 (BHV-5): distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq. Vet. Bras*. 24 (3): 123-131.
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Mniloff J., Desselberger U., Ball L. 2004. *A Virus Taxonomy. The Eighth Report*. Academic Press, San Diego. 1162.
- Ferrari H. F., Luvizotto M.C.R., Rahal P., Cardoso, T. C. 2007. Detection of bovine Herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. *J. Virol. Methods*. 146, p. 335-340.
- Flores E.; Silva A.; Weiblen R. 1998. Neuropatogenicidade do herpesvirus bovino tipo 5 (HVB-5) (avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais. In: *Proc. Simp. Int. Herpesvirus Bov. (Tipo 1 e 5) Vir. Diarréia Viral Bovina 1998*. Anais. 1998,127-137.
- Gomes L. L., Rocha M. A., Costa E. A., Lobato Z. I. P., Mendes L. C. N., Borges, A. S., Leite R. C. & Barbosa-Stancioli E. E. 2002. Detecção de herpesvirus bovino-5 (BHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 54(2):217-220.
- Halfen D.C. & Vidor T. 2000. Infecções por Herpesvirus bovino-1 e Herpesvirus bovino-5. p. 97-107. In: Riet-Correa E., Schild A.L., Mendez M.C., Lemos R.R.A (ed.) *Doença de Ruminantes e Equinos*. Vol.1.2ª ed. Varela Editora e Livraria, São Paulo.
- Lee B. J., Weiss M. L., Mosier D., Chowdhury S. I. 1999. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J. Neurovirol*. 5:474-484.
- Merten O.W. 2002. Development of serum-free media for cell growth production of viruses/viral vaccines-safety issues of animal productus used in serum-free media. In Hendriksen C. D., Sesardic K. Cussler, Editors. *Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccines and hormones*. Dev. Biol.Basel.Karger. 111:233-257.
- Meyer G., Lemaire M., Ros C., Belak K., Gabriel A., Cassart D., Coignoul E., Belak S., Thiry E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus type 1 and 5. *Arch. Virol*. 146:633-652.
- Perez S. E., Bretschneider M. R., Leunda F. A., Osorio E. A., Flores E. F., Odeon A. C. 2002. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol*. 39:437-444.
- Peshev R.; Christensen L.; Christova L. 1998. Comparative molecular epidemiological investigation on different bovine herpes viruses. *Comp. Immunol Microbiol. Infect. Dis*. 21:247-255.
- Riet-Correa G., Duarte M. D., Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Cerqueira V.D., Brito M.F., Riet-Correa F. 2006. Meningoencefalite e poliencefalomalacia causadas por Herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras*.26(1):44-46.
- Riet-Correa E., Vidor T., Schild A.L. & Mendez M.C. 1989. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por Herpesvirus bovino tipo-1. *Pesq. Vet. Bras*. 9:13-16
- 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 herpesvirus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras*. 26(2):123-132.
- Roizman, B. 1992. The Family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol*, 123: 432-445.

- Salvador S.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M. & Osorio A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18:76-83
- Schwyzer, M.; Ackermann, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. 1996. *Vet. Microbiol.* 53: 17-19.
- Spilki F.R., Franco A. C., Teixeira M. B., Esteves P.A., Schaefer R., Schmidt E., Lemos R. A. Roehe P. M. 2003. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. *Pesq. Vet. Bras.* 23(1):1-4.
- Studdert, M. J. 1989. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 125: 584.
- Vidal E., Márquez M., Tortosa R., Costa C., Serafin A., Pumarola M., 2006. Imunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages. *J. Virol.Meth.* 134:15-29.
- Vogel F. S. F., Caron L., Flores E. F.; Weiblen R., Winkelmann E. R., MAYER S. V., BASTOS R. G. 2003. Distribution of bovine herpesvírus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.*, 41(10):4512-4520.

Tabela 1 – Identificação dos bovinos acometidos pelo BHV-5 por idade, delimitação geográfica e sintomatologia durante os anos de 2004 a 2006.

Identificação	Idade	Cidade	Estado	Sintomatologia
N-128/04	8 M	Araçatuba	SP	Decúbito lateral súbito, sialorréia e secreção nasal
N-37/05	18M	Araçatuba	SP	Paralisia flácida dos membros, decúbito lateral, reflexos diminuídos
N-227/05	36M	Araçatuba	SP	Morte súbita e animal encontrado no pasto
PA-41/05	18M	Caracol	M.S	Sintomatologia nervosa, dificuldades para andar, decúbito esternal.
PA- 28/05	4,5 M	Sto. Antônio do Aracanguá	SP	Sem sitomatologia nervosa, apenas diarreia.
PA-24/05	8M	Araçatuba	SP	Ataxia, decúbito, trismo mandibular, bruxismo, sensibilidade cervical e periférica
PA-17/05	36M	Penápolis	SP	Incoordenação motora
PA-15/05	24M	Serranópolis	MS	Secreção nasal, lacrimejamento, sialorréia, cegueira aparente
PA-02/05	14M	Guararapes	SP	Decúbito esternal, sialorréia, dilatação pupilar, paralisia flácida dos membros
PA- 67/05	24M	Cardoso	SP	Emagrecimento rápido, febre alta (41°C), incoordenação e presença de muco nasal
PA-17/04	5M	Cáceres	MS	Incoordenação motora, decúbito esterno-lateral, sialorréia. Sintomas após o manejo e vermifugação
PA-19/04	20M	Sto. Ant. do Aracanguá	SP	Incoordenação, decúbito, paresia e paralisia, dificuldade respiratória.
N-137/06	48M	Araçatuba	SP	Decúbito esternal, paralisia , bruxismo e morte
N-06/06	25M	Araçatuba	SP	Cegueira, opstotono, incoordenação motora e óbito.
PA-31/06	24M	Planalto	SP	Decúbito lateral, anorexia e opstótono
N-138/04	24M	Avanhandava	SP	Morte subita
N-175/04	12M	Rubiácea	SP	Sem sintomatologia e morte
N-282/05	12M	Bauru	SP	Incoordenação motora e morte
N-329/05	8M	Araçatuba	SP	Sialorréia, dificuldade respiratória, decúbito e morte
N-427/05	3M	Penápolis	SP	Decúbito esternal e morte.

Tabela 2. Alterações histopatológicas, cultivo celular e PCR dos bovinos acometidos pelo HBoV-5 durante os anos de 2004-2006

Identif. ^b	Necrose neuronal	Neuronofagia	Manguitos/ Meningite	Malácia	C.I. ^b	Hemorragia	ICC ^b	PCR ^b
N-128/04	++	++	+	++	-	+++	+	+
N-37/05	+++	++	++	++	+	+	+	+
N-227/05	+++	++	+	++	+++	++	+	+
PA-41/05	+++	+++	+++	++	+++	-	+	+
PA-28/05	++	+	++	++	+++	++	+	+
PA-24/05	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
PA-17/05	++	-	-	-	-	+++	+	+
PA-15/05	++	++	++	++	-	+++	+	+
PA-02/05	++	+++	++	-	+	++	+	+
PA- 67/05	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+
PA-17/04	+++	+	+++	+	-	++	+	+
PA-19/04	++	-	-	-	-	+++	+	+
N-137/06	++	++	-	-	-	++	+	+
N-06/06	++	++	+	+	+	+++	+	+
PA-31/06	++	-	+++	+++	-	+++	+	+
N-138/04	++	+++	+++	++	++	+	+	+
N-175/04	+++	++	+++	+++	+	++	+	+
N-282/05	+	-	-	-	-	++	+	+
N-329/05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
N-427/05	+	+	+	+	-	+++	+	+

^a +++ Lesão Acentuada, ++ Moderada, + Discreta, - ausente

^b Identif.- identificação, C.I- corpúsculo de inclusão, ICC- isolamento e cultivo celular, PCR – Reação em cadeia pela polimerase

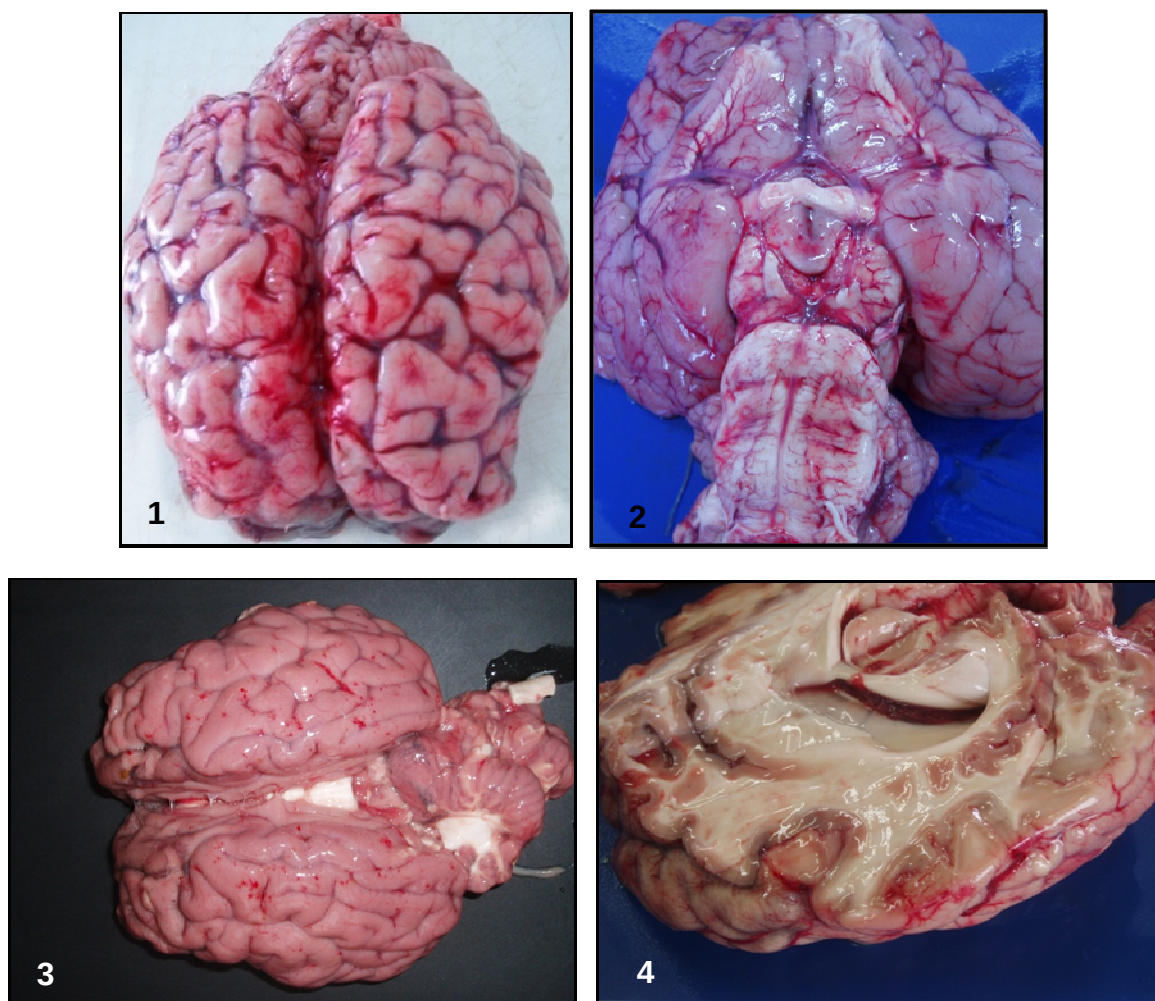


Fig.1. Fotografia macroscópica de encéfalo de bovino acometido por HBoV-5, apresentando áreas de hemorragia e congestão e áreas tumefeitas. Fig.2. Fotografia macroscópica de encéfalo que exhibe congestão e áreas de hemorragia da região ventral. Fig.3. Fotografia macroscópica que mostra áreas focais de hemorragia e circunvoluções achatadas. Fig.4. Fotografia macroscópica de corte sagital de encéfalo, com área de malácia, congestão e hemorragia.

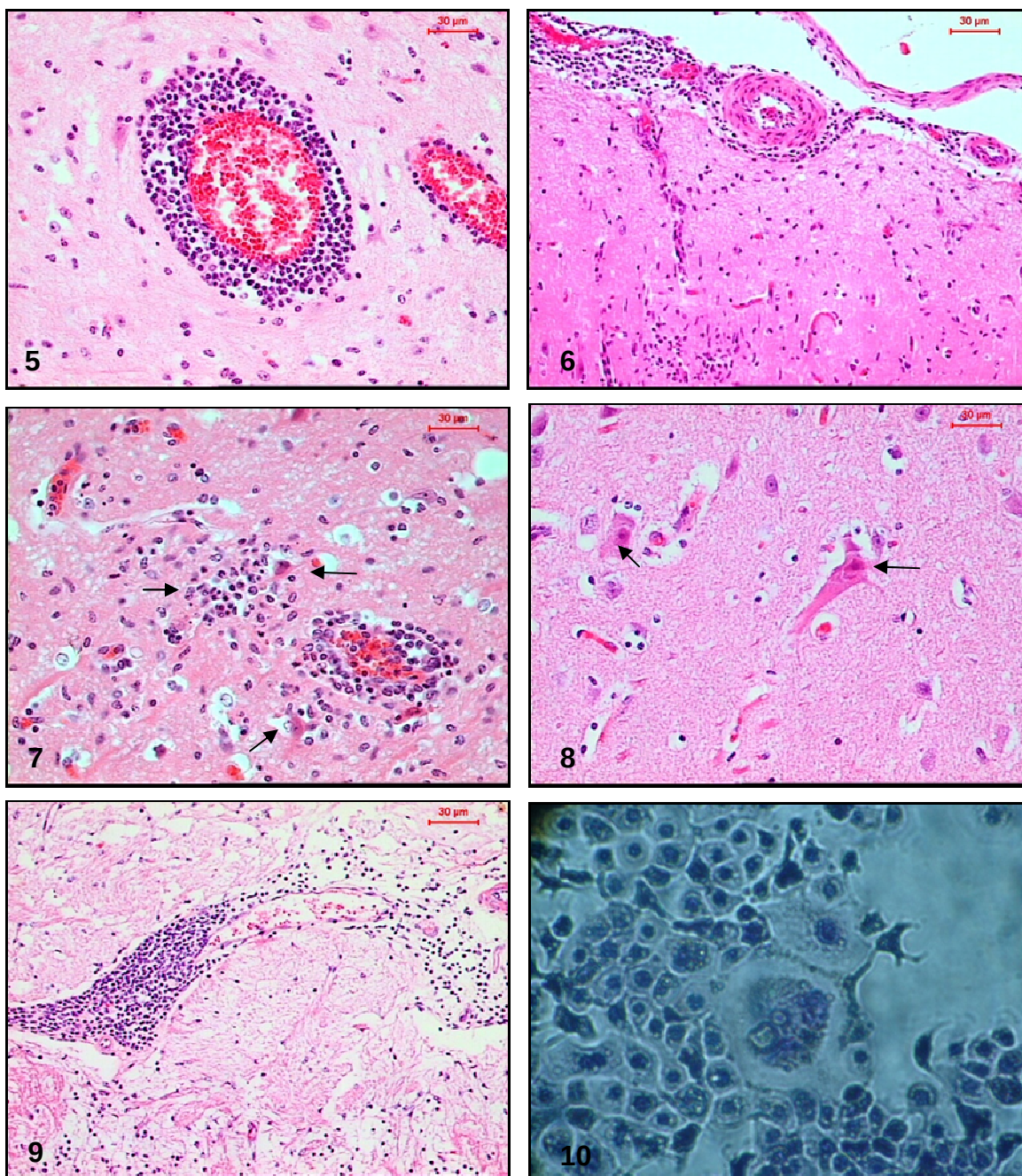


Fig.5. Fotomicrografia da região de córtex frontal exibe manguito perivascular constituído por linfócitos e macrófagos nos casos de meningoencefalite por BoHV-5. HE. Fig.6. Fotomicrografia de córtex frontal que mostra infiltrado inflamatório mononuclear na meninge HE. Fig.7. Fotomicrografia de SNC mostra neuronofagia (setas) e manguito perivascular.HE. Fig.8. Fotomicrografia de encéfalo apresenta corpúsculo de inclusão basofílico intranuclear em neurônio (setas). HE. Fig.9. Fotomicrografia de secção histológica de bulbo olfatório com presença de manguito perivascular formado por diversas camadas de células. HE. Fig.10. Efeito citopático do BHoV-5 em cultura de células MDBK, com formação de células sinciciais. Obj.10X.

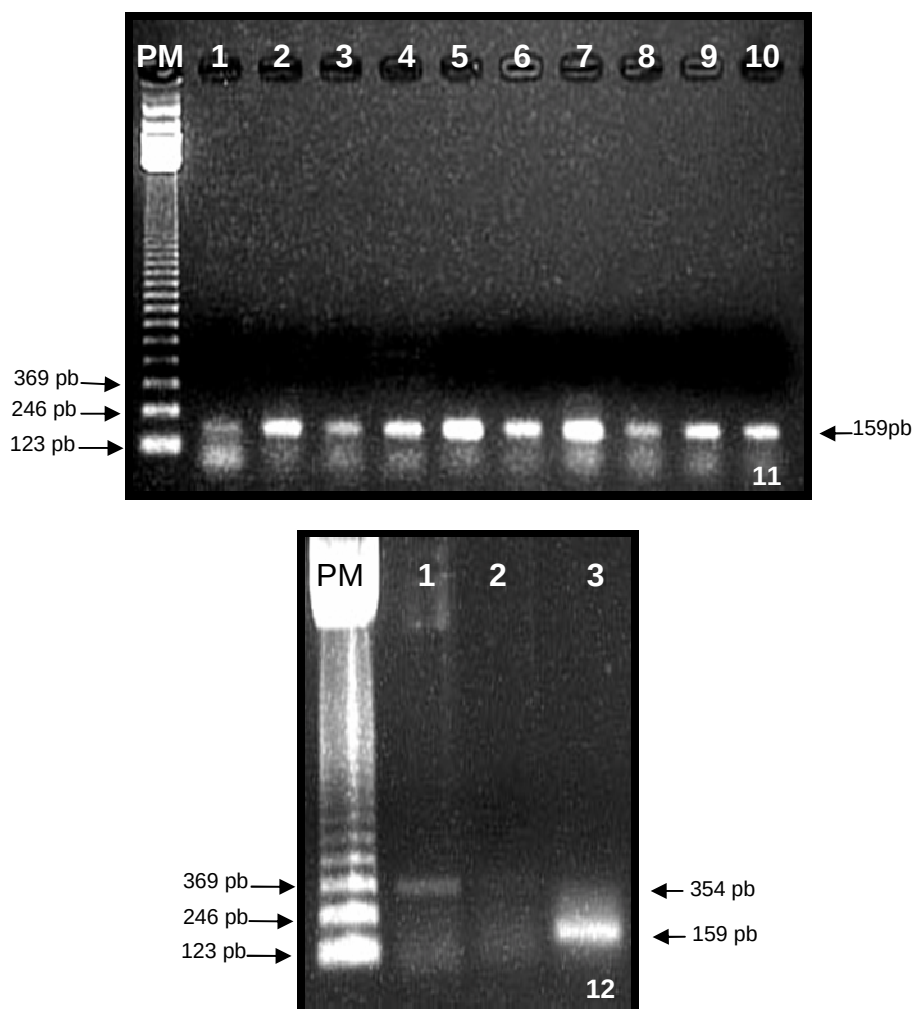


Fig.11. Análise dos produtos de PCR (159 pb) na eletroforese em gel de agarose extraído da sobrenadante das células infectadas com HBoV-5, de 10 amostras de bovinos. Fig.12. Eletroforese em gel de agar 2% corado com brometo de etídeo, amplificação e diferenciação do HBoV-1 e 5 (gene da glicoproteína C). PM – Peso molecular de 123 pb, linha 1 - amostra positiva para HBoV-1; linha 2- controle negativo; linha 3- amostra positiva para HBoV-5.

ANEXO A

Bio-Safety Technology in Production of Bovine *Herpesvirus* Type 5 (BoHV-5) Using an Alternative Serum-Free Medium

¹Tereza C. Cardoso, ²Heitor F. Ferrari, ³Maria Cecília R. Luvizotto and ⁴Clarice W. Arns

¹Laboratório de Virologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP Campus de Araçatuba, Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, SP-Brazil

²Aluno de Pós-graduação Mestrado em Ciência Animal, Fellowship Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil

³Laboratório de Patologia Animal, Universidade Estadual Paulista, UNESP Campus de Araçatuba, Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, SP-Brazil

⁴Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Brazil

Abstract: The detection and growth of bovine herpes virus type 5 (BoHV-5) was evaluated in three different media without foetal bovine serum or animal protein by infecting three different cell lines. The OPTI-PRO, VP-SFM and RPMI 1640 media were supplemented by L-glutamine, antibiotics added by 5µg of insulin-like growth factor (IGF-I) and used to adapt CER, MDBK and CRIB cells in a statistic continuous culture system. The results obtained by CRIB and MDBK cells adaptation showed steady growth after 10th passages in OPTI-PRO medium, 20th passages in VP-SFM medium and 30th passages in RPMI 1640 medium, respectively. The OPTI-PRO and RPMI 1640 media were not able to support CER growth, even supplemented by IGF-1 and present apoptotic cells at 72h post-infection. The CER cells seeded after adaptation by 10th passages in VP-SFM medium added by 5µg/20ml of IGF-1 growth factor revealed the best virus titres compared to MDBK and CRIB cell lines. It was concluded that CER, MDBK and CRIB cells infected by BoHV-5 serotype could be used for laboratory diagnosis propagated on much safer culture system of high biotechnology advances.

Key words: Bovine *Herpesvirus*, BoHV-5, CER cells, MDBK cells, CRIB cells, serum-free media

INTRODUCTION

Bovine Herpes virus type 5 (BoHV-5) is member of the family *Herpesviridae*, sub-family *Alphaherpesvirinae* and is primary etiological agent of non-suppurative meningoencephalitis that causes significant economic losses to beef cattle in South of America. Outbreaks of BoHV-5-associated encephalitis have been reported worldwide with mortality rate close to 100%. In addition, bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is one of the most important cattle pathogens, causing great economic losses to Brazilian cattle industry also^[1-3].

Recently, it was described the cross-protection conferred by BoHV-1 vaccine against BoHV-5 disease. The cross-protection theory is based upon rare occurrence of BoHV-5 associated disease in BoHV-1 endemic area or farms with intense vaccination schedules against BoHV-1^[4]. Otherwise, it has been showed that glycoprotein E is inefficient to produce cross protection between BoHV-1 and BoHV-5^[5]. In fact, the

vaccine against BoHV-1 is routinely formulated by infection of MDBK (Madin Darby bovine kidney) cell line grown in Eagle Minimal Medium (MEM) supplemented by foetal bovine serum. Moreover, this culture system is also used to isolate clinical samples and to perform serum neutralization assays^[3, 6, 7]. Otherwise, it has been reported the efficacy of serum-free vaccine produced to BoHV-1 and bovine parainfluenza type 3^[8].

Foetal bovine serum (FBS) has traditionally been used in cell cultures for vaccine production and it is now widely recognize that FBS can carry heterogeneous contamination such as fungi, bacteria, viruses, microbial nucleic acids and more specially the prion of bovine spongiform encephalopathy (BSE)^[7-10]. It is important to emphasize that FBS can also contain bovine viral diarrhoea virus (BVDV), which is able to replicate in cultured cells from bovine species and often contaminate cells from other non-related species. For this purpose, an alternative culture system, classified as CRIB cells, was developed to avoid cross contamination with bovine viruses in the laboratory^[6].

Moreover, CRIB cells has been reported to be resistant to BVDV infection *in vivo* derived from MDBK cells and obtained by selection and cloning of cells surviving infection by high cytolitic BVDV strain^[6]. For instance, CER cells have been used frequently to isolate and, also propagate rabies virus^[11] and recently, described to support bovine syncytial respiratory virus^[5]. Nevertheless, there is no report describing the CER use on BoHV virus infection until now.

The present study was conducted to apply an alternative technology of serum-free culture system to support BoHV-5 infection and propagation using the CER, MDBK and CRIB cell line as a safe way for virus propagation and isolation.

MATERIALS AND METHODS

Cells and media: The following cells line were used: chicken embryo related cells (CER), a cell hybrid derived from chicken embryo fibroblast and BHK-21 (baby hamster kidney cells clone 21, ATCC CCL-10); MDBK (Madin-Darby bovine kidney cells, ATCC CCL-22) and CRIB cells, which are derived from MDBK and kindly provided by Dr Clarice W Arns (Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Laboratório de Virologia Animal). The cells were grown in flasks of 75cm³ at 37°C, using an initial concentration of 3.5×10^4 cells/ml in a traditional Eagle's minimal essential medium (E-MEM) plus antibiotics and 10% of irradiated bovine foetal serum (GIBCO-BRL). Monolayers were grown to 87% of cell confluence and then the cells were transferred to a serum and protein free culture. The media used were: OPTI-PRO® (GIBCO-BRL); VP-SFM® (GIBCO-BRL) and Advanced RPMI 1460 (GIBCO-BRL) following the manufacture's recommendations. The adaptation to a serum/protein free media was done directly switching the traditional medium to the new ones.

Mycoplasma and exogenous viruses examination: The monolayers were tested for *Mycoplasma* using the general culturing method, described as a combination of liquid and agar media for reported by previous studies. The exogenous bovine viruses, as bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) were tested according to previous studies^[12].

Insulin-like growth factor-1 supplementation: After the cells were adapted to the different media described before, the respective monolayers were rinsed twice with fresh medium and replenished

with OPTI-PRO, VP-SFM and RPMI 1640 added by 5µg/20ml of Insulin - Like Growth Factor-I (IGF-I)^[13].

Annexin V staining: Translocation of phosphatidylserine to the external surface of apoptotic cell membrane was examined by staining of fixed samples for infected and control cells with anti-annexin-V-FITC conjugated mAb. The images were analyzed by immunofluorescence microscope and the images recorded.

Virus infection and propagation: After adaptation in the new system culture, the respective monolayers were infected by 20 clinical samples of BoHV-5 collected from an outbreak in 2005 (São Paulo State-Brazil), previously characterized by immunoperoxidase monolayer assay and PCR, gently supplied by Laboratório Patologia, UNESP-Araçatuba. Adsorption was allowed for 1 hour and half at 37°C. Subsequently the medium was replaced and the flasks were incubated at 37°C during 5 days. The viruses were submitted to infection three times in each cell line. Titration results were confirmed by observation of cytopathic effect (CPE) appearance, describe as being syncytial formation^[3]. The respective titers were calculated by Spearman-Kärber method and expressed as the log₁₀ tissue culture infective dose per 50 (TCID₅₀/50µl) described previously.

Growth characteristics: Growth characteristics of BoHV-5 on CER, MDBK and CRIB cells were assayed in a multiplicity of infection (m.o.i) 1, which had been previously determined for both cells. Adsorption was allowed for 1 hour and half at 37°C and the inoculum removed just after. The respective monolayer were then washed with fresh medium and incubated for different time post-infection (0, 4, 8, 24, 48, 72 and 120 h post-infection, p.i). The supernatant from respective infected monolayers were collected and assayed for BoHV-5 detection by virus neutralization assay. All the experiments were performed in duplicate and the infectious virus calculated according to Spearman-Kärber method as described before^[5].

Statistical analysis: Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test and analysis of variance ANOVA; the least significant difference at $p=0.05$ was determined^[5].

RESULTS

Cell adaptation to serum free media: All the cell lines analyzed here MDBK, CER and CRIB types, were

well adapted to VP-SFM serum free medium. However, only CER cell line was not adapted to OPTI-PRO and VP-SFM media, even after an increase IGF-I concentration (results not shown). The morphological characteristics were preserved as shown on Fig. 1D, F and H and the typical cytopathic effect was visualized of all mammalian cells adapted to VP-SFM medium and infected by BoHV-5 (Fig. 1E, G and I) at 120h post-infection. Monolayer confluence was determined by visual evaluation as illustrated in Fig. 1A, B and C for MDBK cells, 10%, 30% and 80% of confluence, respectively. No *Mycoplasma* and no exogenous virus could be detected in this culture system (data not shown). As shown in Fig. 1A, B and C, the MDBK monolayer morphology was not affected in respect to confluence and adherence characteristic. After cell adaptation, the VP-SFM medium plus IGF-I was the only substrate capable to support all the cell lines studied here (Fig. 1D, F and H). The respective CPE was the same observed by others studies, using the conventional MDBK cultured system^[1, 2, 4, 6] as shown in Fig. 1E, G and I for MDBK, CER and CRIB cells, respectively. In fact, there are many advantages in using serum-free culture systems; first it has been suggested that cells cultured without serum/protein seems to be more favourable for viral infection than cultured by using the serum-supplemented medium; second bovine serum may contains viral inhibitors, such proteases, that decreases the virus stability; and third bovine serum may contains exogenous pathogens and also prions^[7, 13, 14, 15].

Virus titres: Both cell lines were susceptible to infection after adapted to a serum-free media culture. However, the addition of IGF-1 increases the monolayer viability, which had allowed more virus production after 120 post-infection. Even the CPE has started 6h p.i. for all cells analyzed; it was possible to maintain viable 30% of the respective monolayers by addition of IGF-I to the media with no replacement with fresh medium at 120h p.i. (Fig. 1D, F and H). Recently, it has been shown that insulin like growth factor -I (IGF-I) can replace insulin as the main mitogenic factor in serum free cultures. Besides, IGF-I has an antiapoptotic activity, which can protecting cultures fro diverse death-inducing stimuli through interaction with its receptor^[13]. In the resent work, the use of IGF-I, at a unique concentration in all media applied, confers viable cells at 120h pos-infection

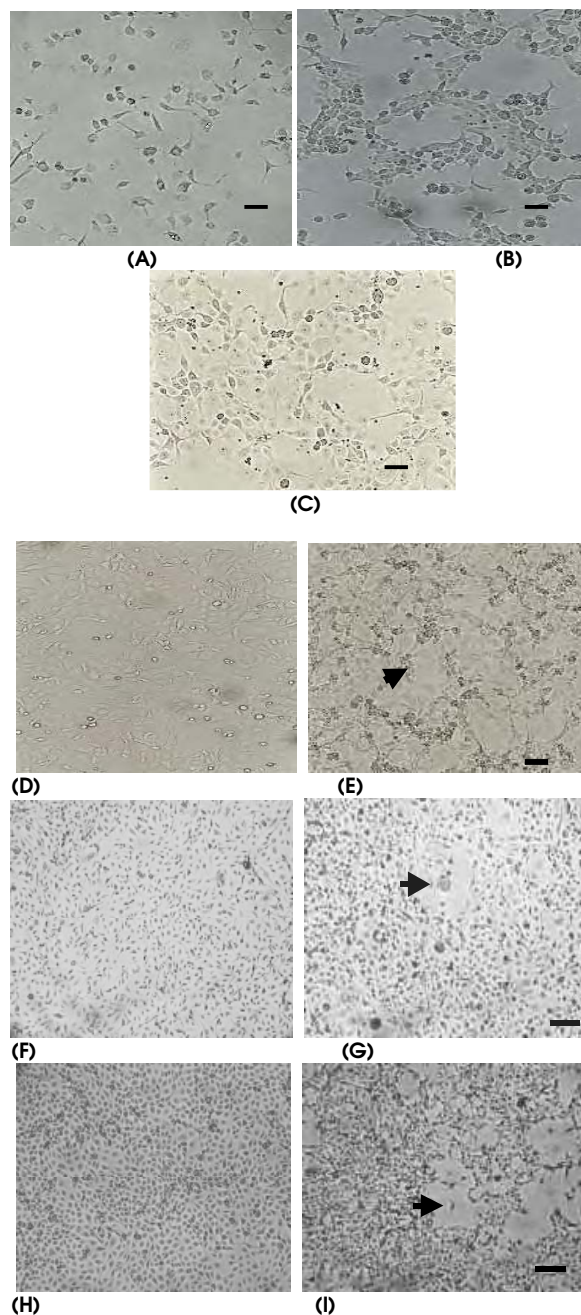


Fig. 1: Characteristic of MDBK monolayer grown on VP-SFM medium; (A) 10% of monolayer confluence; (B) 30% of monolayer confluence; (C) 80% of monolayer confluence; (D) Non-infected MDBK monolayer at 120h of culture on VP-SFM medium; (E) Infected MDBK monolayer at 120h p.i. (narrow CPE); (F) Non-infected CER monolayer at 120h of culture on VP-SFM medium; (G) Infected CER monolayer at 120h p.i. (narrow CPE); (H) Non-infected CRIB monolayer at 120h of culture on VP-SFM medium; (I) Infected CRIB monolayer at 120 p.i. (narrow CPE). Bar 30μm

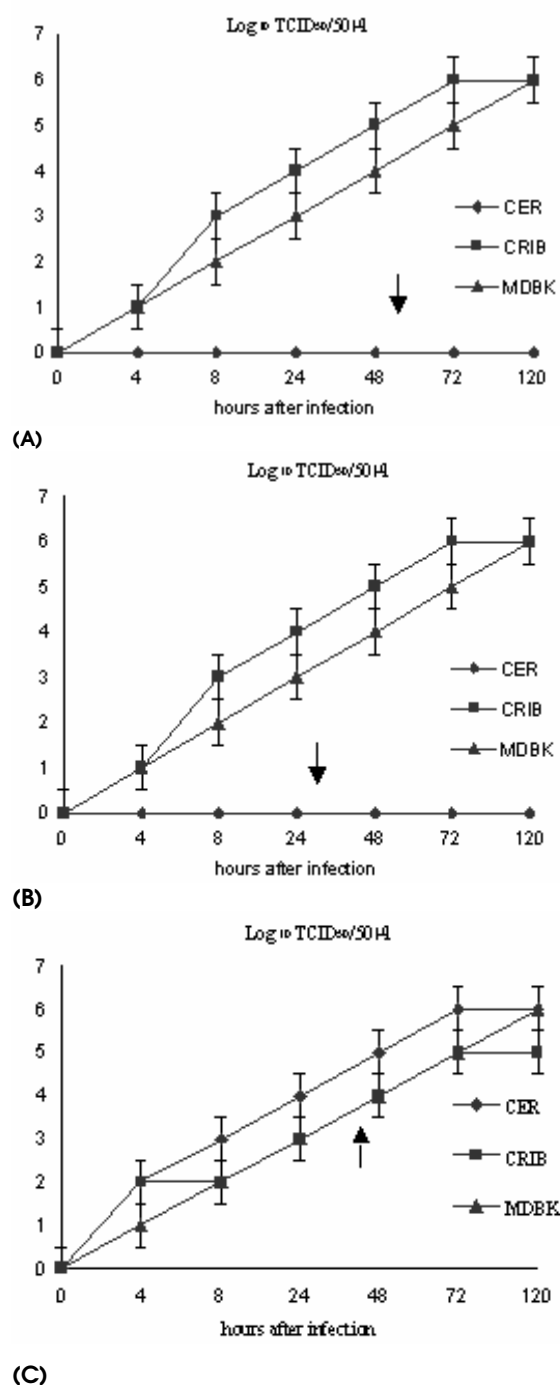
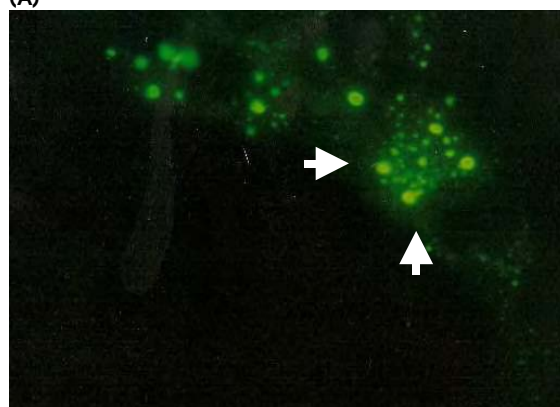


Fig. 2: Comparison of BoHV-5 growth characteristics in MDBK, CER and CRIB cell using the OPTI-PRO medium (A), RPMI-1640 medium (B) and VP-SFM medium (C). Each value is the mean of three infected wells with the respective standard deviation bars, at different time intervals (hour post-infection)



(A)



(B)

Fig. 3: Annexin V staining pattern observed after 72h post-infection for CER, MDBK and CRIB cells (A) Positive intranuclear signal; (B) Negative control. (narrow showing the positive signal). Bar = $30\mu\text{m}$

(Fig. 2A, B and C). To our knowledge, this is the first time demonstration of an addition of IGF-I in commercial media, for supporting MDBK, CER and CRIB cells. According to other studies, the IGF-I supplementation can confer survivability to Chinese Hamster Ovary Cells (CHO) but does not stimulate cell proliferation and is insufficient for growth in serum-free medium unless supplemented with transferrin^[13]. However, this phenomena, was not evaluated in this study.

Growth characteristics and apoptosis: One-step growth curves of the BoHV-5 strain in MDBK, CER and CRIB cells revealed no significant differences ($p=0.89664$) in the infectious virus titres from 0 to 120 h post-infection in VP-SFM media plus IGF-I (Fig. 2C). However, only MDBK and CRIB were able to growth in OPTI-PRO and RPMI 1640 media (Fig. 2A and B), producing titre of $1\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}$ lower comparing to

CER cells grown in VP-SFM added by IGF-I. The CER cells, considered non-permissive cell line, could be infected by BoHV-5, under growth on VP-SFM plus IGF-I medium, produced titres of 1 Log₁₀ TCID₅₀ higher than permissive cells, MDBK and CRIB (Fig. 2C). As demonstrated, the cells presented signals of apoptosis at 72h post-infection, which did not interfere with virus production (Fig. 3A and B). Afterwards, the importance of BoHV growth behaviour in a non-permissive system has been mentioned as a viable alternative culture system, because it allows for the analysis of fine details from particular step where the growth is arrested [4, 14]. In this aspect, it was also demonstrated the ability of CER cells support bovine respiratory syncytial virus infection [5]. In fact, the present work do not evaluated the convention culture system used serum supplementation to make a parallel of cell proliferation. However, the commercial VP-SFM was the only medium applied successfully in producing virus titres in all systems analyzed. This same medium was used to produce rabies virus vaccine and demonstrated satisfactory virus particles production on microcarriers system, however it was not used the IGF-I supplementation [14]. In the other hand, the RPMI 1640 medium described as suitable to MDCK cells and canine virus vaccines was also efficient to support BoHV 5 infection in MDBK and CRIB cells in the present study [12].

CONCLUSION

In addition to primary and diploid cells, continuous cell lines have been accepted for the use in the production of viral vaccines for human and there have been a few industrial-scale productions of virus entirely using a serum/protein free process. Moreover, the use of cell culture is increasing exponentially and new *in vitro* alternatives are constantly being developed. Herein, VP-SFM medium was suitable for the production of BoHV-5 from CER cell culture. In addition, the MDBK and CRIB cells, were well adapted to serum-free media applied here, accomplished by desirable production of virus infective particles. Finally, this system is an alternative for the development of a bioprocess for the safe vaccines and also, biological *in vitro* methodologies for bovine *Herpesvirus* studies.

REFERENCES

1. Delhon, G., M.P. Moraes, Z. Lu, C.L. Afonso, E.F. Flores, R. Weiblen, G.F. Kutish and D.L. Rock, 2003. Genome of Bovine Herpesvirus 5. *J. Virol.*, 77: 10339-10347.
2. Diel, D.G., S.R. Almeida, M.C.S. Brum, R. Dezengrini, R. Wieben and E.F. Flores, 2007. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2006.12.019.
3. Silva, A.D., F.R. Spilki, A.C. Franco, P.A. Esteves, S.O. Hübner, D. Driemeier, A.P. Oliveira, F. Rijsewijk and P.M. Roehe, 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5. *Vaccine*, 24: 3313-3320.
4. Del Médico Zajac, M.P., M. Puntel, P.I. Zamorano, A.M. Sadir and S.A. Romera, B., 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.*, 81:327-334.
5. Spilki, F.R., R.S. Almeida, J. Campalans and C.W. Arns, 2006. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Meth.*, 131:130-133.
6. Flores, E.F. and R.O. Donis, 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology*, 208: 565-575.
7. Merten, O.W. 2002. Development of serum-free media for cell growth production of viruses/viral vaccines-Safety issues of animal productus used in serum-free media. In: Hendriksen C., D. Sesardic, K. Cussler, Editors. *Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccines and hormones*. Dev. Biol. Basel, Karger, 111: 233-257.
8. Makoschey, B., J.R. Patel and P.T.J.A. van Gelder, 2002. Serum-free produced bovine herpesvirus type -1 and bovine parainfluenza type 3 virus vaccines are efficacious and safe. *Cytotechnology*, 39: 139-145.
9. Butler, M., A. Burgener, M. Patrick, M. Berry, D. Moffatt, N. Huzel, N. Barnabé and K. Coombs, 2000. Application of a serum free medium for growth of vero cells and production of Reovirus. *Biotech. Prog.*, 16: 854-858.
10. Cardoso, T.C., M.C.B. Teixeira, N. Fachin, T.L. Camargo, D.E. Gomes, A.C.O. Junior and B. Anselmo, 2005. Evaluation of serum and animal - free media for the production of infectious bronchitis virus (M41) strain in a continuous cell line. *ALTEX*, 3:152-156.
11. Cardoso, T.C., L.H. Queiroz-Silva, S.E. Silva, A. Albas, P.E. Pardo, A.H. Tanaka, L.B. Cossy and S.H.V. Perri, 2006. Chicken related (CER) cell line for quantification of rabies neutralizing antibody by fluorescent focus inhibition test. *Biologicals*, 34: 29-32.

12. Mochizuki, M., 2006. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. *Vaccine*, 24: 1744-1748.
13. Sunstrom, N.A.S., R.D. Gay, D.C. Wong, N.A. Kitchen, L. DeBoer and P.P. Gray, 2000. Insulin-Like Growth Factor-I and transferring mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells. *Biotech. Prog.*, 16:698-702.
14. Frazzati-Gallina, N. M., R.L. Paoli, R.M. Mourão-Funches, S.A.C. Jorge and C.A. Pereira, 2001. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J. Biotech.*, 92: 67-72.
15. Murata, T., Y. Takashima, X. Xuan and Otsuka. 1999. Growth behavior of bovine herpesvirus-1 in permissive and semi-permissive cells. *Virus Res.*, 61: 29-41.
16. Genzel, Y., J.B. Ritter, S. König, R. Alt and U. Reichl, 2005. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotech. Prog.*, 21: 58-69.

ANEXO B

Detection of Bovine *Herpesvirus* type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: A useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis

Ferrari¹, H.F., Luvizotto², M.C.R., Rahal⁴, P., Cardoso³, T.C.

¹UNESP - Master in Animal Science, Veterinary School, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

²UNESP - DCCR, Laboratório de Patologia, Veterinary School, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

³UNESP - DAPSA, Laboratório de Virologia Animal, Veterinary School, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

⁴UNESP- IBILCE, Laboratório de Estudos Genômicos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the application of PCR technique for the detection of BoHV-5 in routinely formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissues in 20 naturally infected calves affected by fatal meningoencephalitis. Brains were divided into two halves, one kept fresh for virus isolation and PCR assay, targeting the glycoprotein C gene from BoHV-5 genome. The other half brain, corresponding to posterior cortex region, was submitted to formalin fixation and embedded into paraffin blocks for microscopic evaluation and total DNA isolation. Most of the slides showed severe multifocal nonsuppurative encephalitis with neuronal degeneration, neurophagia, and no acidophilic intranuclear inclusions could be found in neurons and glial. The 20 fresh samples were confirmed, by virus isolation and PCR assay, as having the BoHV-5 virus and, respective glycoprotein C sequence, whilst 15 of 20 formalin-fixed, paraffin embedded samples were considered positive for the same analysis. The results revealed the first description of PCR efficiency, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded brain collected from naturally infected calves, improving the detection of BoHV-5 from archival samples in South of America.

Keywords: Bovine *Herpesvirus* type 5, BoHV-5, PCR, cell culture, formalin-fixed paraffin embedded tissues.

1. Introduction

Bovine *Herpesvirus* type 5 (BoHV-5) is the etiological agent of bovine encephalitis, isolated firstly in Argentina and Australia and later in Canada, Hungary, Italy and the USA (Carrillo et al., 1983; Metzler et al., 1986). It causes epidemics, affecting calves under 1 year-aged and the mortality rate is 100%, classified as being an enveloped double strand DNA virus belonging to the family *Herpesviridae*, subfamily, genus *Varicellovirus* (Alegre et al., 2001; Delhon et al., 2003).

Like other members of *Alphaherpesvirus*, it establishes a lifelong latent infection in sensory nerve ganglia after acute infection, whereas the infection is manifested by occasional reactivation of infection providing an adequate means of transmission and spread, generally only detected by outbreaks. More recently, it has been reported that cross-protection against BoHV-5 and BoHV-1, is

provided by compulsory vaccination (Belknap et al., 1994; Diel et al., 2003; Del Médico Zajac et al., 2006).

In South of America, this type of encephalitis is diagnosed frequently as *Lyssavirus* infection and the negative tissues are fixed with formalin and embedded in paraffin for veterinary pathology archives latter (Cardoso et al., 2004; Cardoso et al., 2006). Due to significant losses in cattle industry as a result of BoHV-5 infection worldwide, America and European Community have strict sanitary controls of semen and embryos, establishing effective eradication programs, which affect the international meat industry. Brazil represents the first country in the world market as a source of meat to Europe and Asia, which requires revision of sanitary measures (Flôres et al., 2003; Del Médico Zajac et al., 2006; Silva et al., 2006; Diel et al., 2007).

In the case of BoHV-5 diagnosis, virus isolation is also undertaken to confirm the etiological agent. However this procedure is time consuming requires expensive laboratory reagents and special technical expertise. Generally, low-yield is often caused by low concentrations of viable virus particles from fresh tissues collected after death. In fact, due to the lack of availability of fresh tissue specimens and acute- and convalescent –phase serum, tissue-based diagnostic methods such Immunohistochemistry (IHC) is often the first choice for diagnosis. However, the use of monoclonal antibodies to detect BoHV-5 specific antigens, from autopsy tissues, became sporadic, due to the high cost of the reagents, especially when a large number of samples must be tested (Belknap et al., 1994; Ely et al., 1996; Roehe et al., 1997; Flôres et al., 2003; Vidal et al., 2006; Bhatnagar et al., 2007).

Several PCR-based methodologies have been developed for rapid detection of BoHV-5 in fresh tissue, in spite of the detection of BoHV-5 from fixed tissues be largely unexplored, particularly for routinely processed bovine autopsy specimens. Recovering nucleic acid from archived formalin-fixed, paraffin embedded blocks would significantly expand the opportunity in understanding the BoHV-5 epidemiology obtained from negative samples for rabies infection and bovine spongiform encephalopathy disorder (Ely et al., 1996; Belknap et al., 1994; Chan et al., 2001; Cardoso et al., 2004; Claus et al., 2005; Cardoso et al., 2006; Meyer et al., 2001; Vidal et al., 2006).

The aim of this study was to evaluate the applicability of PCR assay for the detection of BoHV-5 in routinely processed bovine formalin-fixed, paraffin-embedded brain and to compare these achieves with those obtained using conventional virological methods.

1. Materials and Methods

2.1 . Samples and general procedures

For the present study 20 cattle brains diagnosed as negative for rabies virus and one health control specimens were used. These brains were obtained from necropsy routine at veterinary school belonging to the University of São Paulo State from 2004 and 2006 years. All cases studied showed clinical sign at the anti-mortem inspection of fatal encephalitis and were male cattle with their ages ranged 1 year or less. The whole brain was sampled and sectioned sagittally into two halves; one half was homogenized by addition of 5ml of Minimal Essential Medium (MEM Gibco-BRL cat # 61100-061), plus antibiotics centrifuged, filtrated and the supernatant stored at -86°C until use in different room to avoid cross contamination. The other half was immersed in 10% phosphate-buffered formalin for 1 week or more (Vogel et al., 2003).

2.2. Histopathology analysis

The posterior cortex region immersed in 10% phosphate-buffered formalin were sectioned into 10-15mm thick tissue sections, blocked and immersed in 98% formic acid during 24 h and embedded

in paraffin wax. Three-micrometer-thick sections were then obtained for routine haematoxylin and eosin (H&E) stain and respective microscopic lesions characterized at least by two different pathologists. Non-stained sections were submitted to DNA extraction (Ely et al., 1996).

2.3. Virus isolation

All samples were submitted to virus isolation using the MDBK cells (Madin-Darby bovine cell line ATCC- CCL-22), CRIB cells (derived from Madin-Darby bovine cell line) described as being resistant to BVDV infection and CER cells (hybrid of BHK-21 cell and chicken fibroblast). Cells were cultured on serum-free medium Advanced RPMI 1640 (Gibco-BRL cat # 12633) without fetal bovine serum and/or animal protein. Positive BoHV-5 strain was gently provided from Instituto Biológico, São Paulo, Brazil. Non-infected cells were used as negative control of virus isolation and positive results were determined by the cytopathic effect resulted from cell infection and characterized by immunoperoxidase assay in some uncertain results (Flores et al., 1995; Spilki et al., 2006; Cardoso et al., 2007).

2.4. DNA extraction and polymerase chain reaction

2.4.1. DNA extraction from fresh brain and cell culture supernatant

Three different methods for DNA extraction were analyzed using fresh brain suspension. The first was the DNAzol® (Invitrogen cat # 10503-027), second Easy-DNA™ (Invitrogen cat # 45-0424) and last the UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 (v/v) (Invitrogen cat # 15593-031). For all the methods it was used 200µl of the samples and a primary enzymatic digestion by the addition of an extraction buffer (10mM Tris, 1mM disodium ethylene diamine tetraacetic acid-EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulphate SDS, 50µg/ml proteinase K) performed only in the last protocol. The DNA was precipitated with 1ml of 100% ethanol incubated over-night under -86°C temperature and centrifuged at 16 000 g for 20 min in the next day. The pellet obtained was rinsed with 1 ml of 70% ethanol, dried and re-suspended in 15µl of DEPEC water and stored at -86°C until use. The DNA from supernatant of infected cells was extracted using the Easy-DNA™ protocol.

2.4.2. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues

DNA was isolated from processed material according to Shi et al. (2004) with some modifications. Briefly, 500µl of 0.1M NaOH solution was added to each microtube containing 3 slices of 10µm of each block and heated at 121°C during 20min in automatic autoclave. Because, the UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl protocol was found to be better than the other 2 procedures after further examination, it was chosen for DNA isolation, just after cooling time of 5 min according to manufacture's instructions. The upper aqueous phase supernatant, obtained was carefully removed to another clean microtube, adding 0.1 volume of 3M sodium acetate and again mixed, followed by addition of 1ml ethanol and incubation at -86°C overnight. The precipitated DNA was centrifuged at 12,000 g at 4°C and the supernatant discarded and dissolved in 20µl ultra pure water after complete drying and stored at -20°C until use (Chan et al., 2001; Shi et al., 2004)

2.4.3. Evaluation of DNA yields

Using a photometer (Smart Spect 3000; Bio-rad, CA, USA) the amount of DNA yield obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded blocks was measured and the optimal concentration for the PCR assays was calculated as being $\cong$ 200ng/µl of DNA for all PCR assays (Shi et al., 2004).

2.5. PCR assay

The PCR was carried out as recommended by Claus et al. (2005) with some modifications. The chosen primers were B5 specific for BoHV-5 (5'-CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' nt 322-339) and consensus primer designated Bcon (5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' nt 519-538) able to amplify 159bp from BoHV-5 (glycoprotein C gene). It was used the beta actin gene as a house keeping internal control for all PCR performed here (GenBank access number LOC 206456). The PCR reaction was carried out in a solution containing $\approx$ 200ng/ μ l of extracted DNA and 12,5 μ l of PCR 2 x reaction mix containing 20pmol of each primer, 1.6mM of $MgCl_2$ and 2.5 units/25 μ l reaction (Invitrogen cat # 11904-01). The amplified products were analyzed by electrophoresis in a 1,2 % agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml) in TBE buffer pH 8,4 and visualized under UV light. Gel images were captured using Kodak DC290 digital camera and ADOBE 8.0 software.

2.6. Sequencing of PCR amplification products

Amplicons obtained from formalin-fixed, paraffin embedded were purified using the QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, USA) and sequenced in MegaBace 1000/Automated 96 capillary DNA sequencer (Amersham Biosciences, UK) according to Claus et al. (2005).

2. Results

The histological lesions were mainly classified as severe multifocal nonsuppurative encephalitis with neuronal degeneration, neurophagia, and not always the acidophilic intranuclear inclusions in neurons and glial cells could be observed (data not shown).

The comparison among virus isolation, polymerase chain reaction and DNA yields showed that, in all samples, the glycoprotein C from BoHV-5 was detected by PCR and infective virus demonstrated by infecting three different cell lines (Tab. 1 Fig 1B). DNA extraction from fresh brain suspensions using the Easy-DNA™ protocol revealed the most efficient method for PCR, where 100% were positive (Tab.2 and Fig.1A), whilst DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, by the same way, showed 15 positive in a total of 20 samples tested (Tab. 2, Fig. 1 A and Fig. 2C).

In all DNA extracted from formalin-fixed, paraffin embedded blocks were considered well preserved with yields ranged from 1,05 to 1,83, however in 5 of 20 samples the results were negative with yield of 1,70, 1,52, 1,61, 1,17 and 1,05, respectively. All positive PCR generated a fragment of 159bp (Fig 2A, B and C), confirmed to be expected portion of BoHV-5 glycoprotein C gene and the beta actin house keeping gene was amplified in all the samples (result not shown).

3. Discussion

Interesting attempts to detect BoHV-5 using the immunoperoxidase, polymerase chain reactions and virus isolation, from naturally and experimentally infected cattle have been published worldwide. However the direct comparison among these methodologies is infrequently described and the reason could be the unknown of BoHV-5 localization in brain steam. In addition, BoHV-5 is frequently diagnosed by imunoperoxidase assay, using monoclonal and/or polyclonal antibodies, and confirmed by virus isolation. Otherwise, the prolonged storage of clinical samples, while routine studies were being conducted, could result in loss of sensitivity of these assays (Meltzer et al., 1986; Belknap et al., 1994; Ely et al., 1996; Alegre et al., 2001; D'Arce et al., 2002; Mayer et al., 2006; Diel et al., 2007).

The controversial aspects of BoHV-5 distribution into the nervous system have been demonstrated. Most of these studies have indicated the posterior cortex as the most suitable region for

BoHV-5 detection, in spite of no infectivity and/or viral antigens has been demonstrated (Flôres et al. 2003). Studies were made to trace a parallel between the BoHV-5 diagnosis and histopathological lesions. In fact, the lesions varied, where most of all consisted from moderate to severe perivascular infiltrates within multiple sections of the brain, as reported elsewhere. Moreover, it is not possible to visualize acidophilic intranuclear inclusions in most of the slides, which could characterize some proteins but not certify virus infection (Ely et al., 1996;; D'Arce et al., 2002; Rohe et al., 1997).

In all samples analyzed in this study, the BoHV-5 was detected by virus isolation, PCR and confirmed by sequencing the glycoprotein C gene, in contrast to previous reports that have been demonstrated lower sensitivity for the same analysis (Claus et al., 2005). It is important to consider time of necropsy, disease stage and severity of brain lesions to obtain efficiency in molecular techniques (Carrilo et al., 1983; Meltzer et al., 1986; Belknap et al., 1994; Ely et al., 1996; Mayer et al., 2006; Diel et al., 2007).

PCR-based techniques for the detection of BoHV-5 from fresh specimens have been extensively explored. However the application of PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissues has been very limit in veterinary practice due to the negative results, usually found by analysis of fixed tissues, probably caused by the cross-linking reactions among proteins and nucleic acids (Bhatnagar et al., 2007; Cox et al., 2006; Indamone and Noguchi, 2003; Sato et al., 2001; Shi et al., 2002; Shi et al., 2004). In addition, the RNA and DNA extraction methods from Bouin's fixed tissues has been demonstrated that heat the DNA just before the PCR be conducted improve an important enzymatic reaction (Bonin et al., 2007). In fact, the use of Bouin's as fixative should be avoided, because the picric acid leads to the rapid degradation of all type of nucleic acid, phenomena not observed in formalin buffered fixative.

In all formalin-fixed, embedded-paraffin samples of one half brain showed five negative results for BoHV-5 in 20 samples analyzed, which might be caused from variable virus distribution as demonstrated before (Belknap et al., 1994; Flôres et al., 2003; Vogel et al., 2003; Mayer et al., 2006). Another important biological observation is the virus reactivation after the first exposure to infection. In fact, the acute phase of the disease differ totally from the chronic reactivation stage, and sample additional sites of paraffin-embedded blocks should improve the BoHV-5 DNA diagnosis in nearby areas in brain (Meyer et al., 2001)

Despite of all these challenges, PCR has advantage of speed, sensitivity and specificity for viral DNA detection, in comparison to conventional virological methods. Herein, 15 of 20 samples (75%) were amplified by PCR from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and all fresh samples were positive after virus isolation latter confirmed by positive PCR amplifications. Besides, the choice of a low weight amplified product (159bp) from glycoprotein C gene from BoHV-5 was based on the fact that long term fixation allow to amplify better DNA fragments ranging from 100-200bp of weight (Cox et al., 2006).

In addition, collect fresh brain just after necropsy avoid signs of necrosis and protects the DNA from chemical damages by nucleases, phenomena normally observed in inflammatory tissues. In consequence, viral DNA can be easily extracted using methods that are efficient in dissociate DNA from other cellular constituents and, also separate it from associated proteins. (Chan et al., 2001; Sato et al., 2001; Shi et al. 2002; Inadome et al., 2003; Bonin et al., 2005).

In summary, paraffin wax embedded tissues are a valuable source of DNA for analysis and during more than a century of diagnostic practice, a large number of archival histopathology banks have been established worldwide. As shown, the simplified procedure of recover the BoHV-5 DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues provides an easier, cheaper and effective approach to be used in veterinary virology.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (2006/51663-06). The authors would like to thanks to Instituto Biológico, São Paulo, Brazil to provide the cells.

References

- Alegre, M., Nanni, M., Fondevila, N., 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation for bovine Herpesvirus 1 and 5. *J. Vet. Med. B.* 48, 613-621.
- Belknap, E.B., Collins, J.K., Ayers, V.K., Schulthesis, P.C., 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). *Vet. Pathol.* 31, 358-365.
- Bhatnagar, J., Guarner, J., Paddock, C.D., Shied, W.J., Lancotii, R.S., Marfin, A.A., Campbell, G.L., Zaki, S.R., 2007. Detection of West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues by RT-PCR: A useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic methods. *J. Clin. Virol.* 38, 106-111.
- Bonin, S., Petrera, F., Rosai, J., Stanta, G., 2005. DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. *J. Clin. Pathol.* 58, 313-316.
- Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Luvozotto, M.C.R., Arns, C.W., 2007. Bio-safety technology in production of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 3, 125-130.
- Cardoso, T.C., Pilz, D., 2004. Wild rabies virus detection by plaque assay from naturally infected brain in different species. *Vet. Microbiol.* 103, 161-167.
- Cardoso, T.C., Queiroz-Silva, L.H., Silva, S.E., Albas, A., Pardo, P.E., Tanaka, A.H., Cossy, L.B., Perri, S.H.V., 2006. Chicken related (CER) cell line for quantification of rabies neutralizing antibody by fluorescent focus inhibition test. *Biologicals.* 34, 29-32.
- Carrillo, B.J., Ambroggi, A., Schudel, A.A., Vasquez, M., Dahme, E., Pospichil, A., 1983. meningoencephalitis caused by an IBR virus in calves in Argentina. *J. Vet. Med. B.* 30, 327-332.
- Chan, P.K.S., Chan, D.P.C., To, K-F., Yu, M.Y., Cheung, J.L.K., Cheng, A.F., 2001. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J. Clin. Pathol.* 54, 401-403.
- Claus, M.P., Aferi, A.F., Folgueras-Flatschart, A.V., Wosiacki, S.R., Médici, K.C., Alfieri, A.A., 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Meth.* 128, 183-188.
- Cox, L.M., Schray, C.L., Luster, C.N., Stewart, Z.S., Korytko, P.J., Khan, K.N.M., Paulauskis, J.D., Dunstan, R.W., 2006. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp. Mol. Pathol.* 80, 183-191.
- D'Arce, R.C.F., Almeida, R.S., Silva, T.C., Franco, A.C., Spilki, F., Roehe, P.M., Arns, C.W., 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88, 315-324.
- Del Médico Zajac, M.P., Puntel, M., Zamorano, P.I., Sadir, A.M., Romera, S.A.B., 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 81, 327-334.
- Delhon, G., Moraes, M.P., Lu, Z., Afonso, C.L., Flores, E.F., Weiblen, R., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2003. Genome of Bovine Herpesvirus 5. *J. Virol.* 77, 10339-10347.
- Diel, D.G., Almeida, S.R., Brum, M.C.S., Dezengrini, R., Wieben, R., Flores, E.F., 2007. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 121, 256-267.
- Ely, R.W., D'Offay, J.M., Ruefer, A.H., Cash, A.H., 1996. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed-embedded brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 487-492.
- Flôres F.S., Flôres, V., 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.
- Flores, E.F., Donis, R.O., 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology.* 208, 565-575.

- Inadome, Y., Noguchi, M., 2003. Selection of higher molecular weight genome DNA for molecular diagnosis from formalin-fixed material. *Diag.Mol.Pathol.* 12, 231-236.
- Mayer, S.V., Quadros, V.L., Vogel, F.S.F., Winkermann, E.R., Arenhart, S., Weiblen, R., Flores, E.F., 2006. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection I experimentally infected rabbits results in a boarder distribution of latente viral DNA in the brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 335-343.
- Meltzer, 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., Ros, C., Belák, K., Gabriel, A., Cassart, D., Coignoul, E., Belák, 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.
- 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 herpesvirus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 17, 41-44.
- Sato, Y., Sugie, R., Tsuchiya, B., Camella, T., Natori, M., Mukai, K., 2001. Comparison of the DNA extraction methods for polimerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diag. Mol. Pathol.* 9, 107-116.
- Shi, S-R., Cote, R.J., Wu, L., Liu, C., Datar, R., Shi, Y., Liu, D., Lim, H., Taylor, C.R., 2002. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J. Histochem.Cytochem.* 50, 1005-1011.
- Shi, S-R., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, R.J., Taylor, C.R., 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem. Cell. Biol.* 122, 211-218.
- Silva, A.D., Spilki, F.R., Franco, A.C., Esteves, P.A., Hübner, S.O., Driemeier, D., Oliveira, A.P., Rijsewijk, F., Roehe, P.M., 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5. *Vaccine.* 24, 3313-3320.
- Spilki, F.R., Almeida, R.S., Campalans, J., Arns, C.W., 2006. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Meth.* 131, 130-133.
- Vidal, E., Márquez, M., Tortosa, R., Costa, C., Serafin, A., Pumarola, M., 2006. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in is early stages. *J. Virol. Meth.* 134, 15-29.
- Vogel, F.S.F., Caron, L., Flores, E.F., 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Virol.* 77, 10339-10347.

Table 1

Comparison between polymerase chain reaction results obtained from supernatant of the 3rd cell passage on MDBK, CRIB and CER monolayer and formalin-fixed-embedded paraffin.

Samples	Supernatant of 3 rd infected cell passages			Formalin-fixed, paraffin embedded tissues	
	MDBK	CRIB	CER	DNA yield 260/280nm	PCR ratios
N-282/05	+	+	+	1,23	+
N-175/04	+	+	+	1,30	+
N-227/05	+	+	+	1,83	+
N-138/04	+	+	+	1,70	—
N-41/05	+	+	+	1,65	+
N-427/05	+	+	+	1,80	+
N-502/06	+	+	+	1,35	+
N-351/05	+	+	+	1,63	+
N-156/05	+	+	+	1,07	+
N-31/05	+	+	+	1,52	—
N-184/05	+	+	+	1,57	+
N-329/05	+	+	+	1,47	+
N-156/05	+	+	+	1,61	—
N-191/05	+	+	+	1,17	—
N-137/06	+	+	+	1,52	+
PA-17/05	+	+	+	1,55	+
PA-24/05	+	+	+	1,67	+
PA-06/06	+	+	+	1,75	+
PA-15/05	+	+	+	1,05	—
N-128/04	+	+	+	1,55	+

Table 2

Comparison between DNA extraction and polymerase chain reaction assay performed on fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded samples.

Results	PCR results			
	Fresh brain samples			Formalin-fixed, paraffin embedded samples
	Easy-DNA™	DNAzol®	UltraPure™	UltraPure™
Positive	20 ^a (100%)	18 (90%)	17 (85%)	15 (75%)
Negative	0	2 (10%)	3 (15%)	5 (25%)

a- Number of positive samples related to a total of samples analyzed by PCR reaction (n=20).

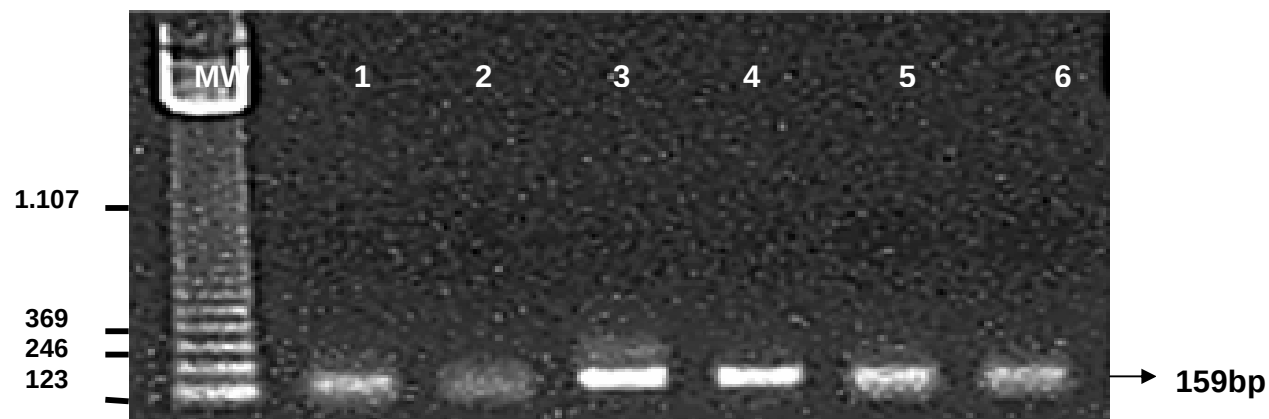
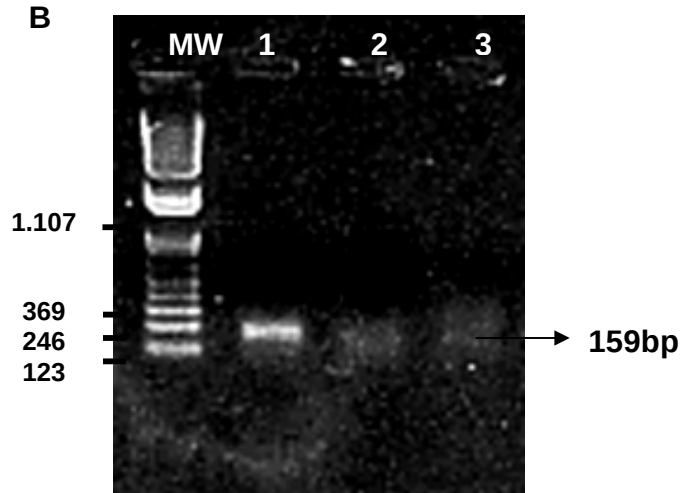
A**B**

Fig.1. Analysis of PCR products (159bp) by agarose gel electrophoresis of extracted BoHV-5 DNA from supernatant of infected cells, fresh and formalin-fixed, paraffin embedded samples. Lane MW: 123bp ladder (Invitrogen™, Life Technologies, USA). Panel A: supernatant of MDBK cells infected by known positive strain of BoHV-5 (lanes 1-2), formalin fixed, paraffin embedded block from sample N-389/05 (lane 3-4), fresh brain suspension from N-389/05 sample (lane 5-6). Panel B: supernatant of MDBK cells infected by known positive strain of BoHV-5 (lane 1), fresh brain from non-symptomatic cattle (lane 2), supernatant from non-infected MDBK cell (lane 3).

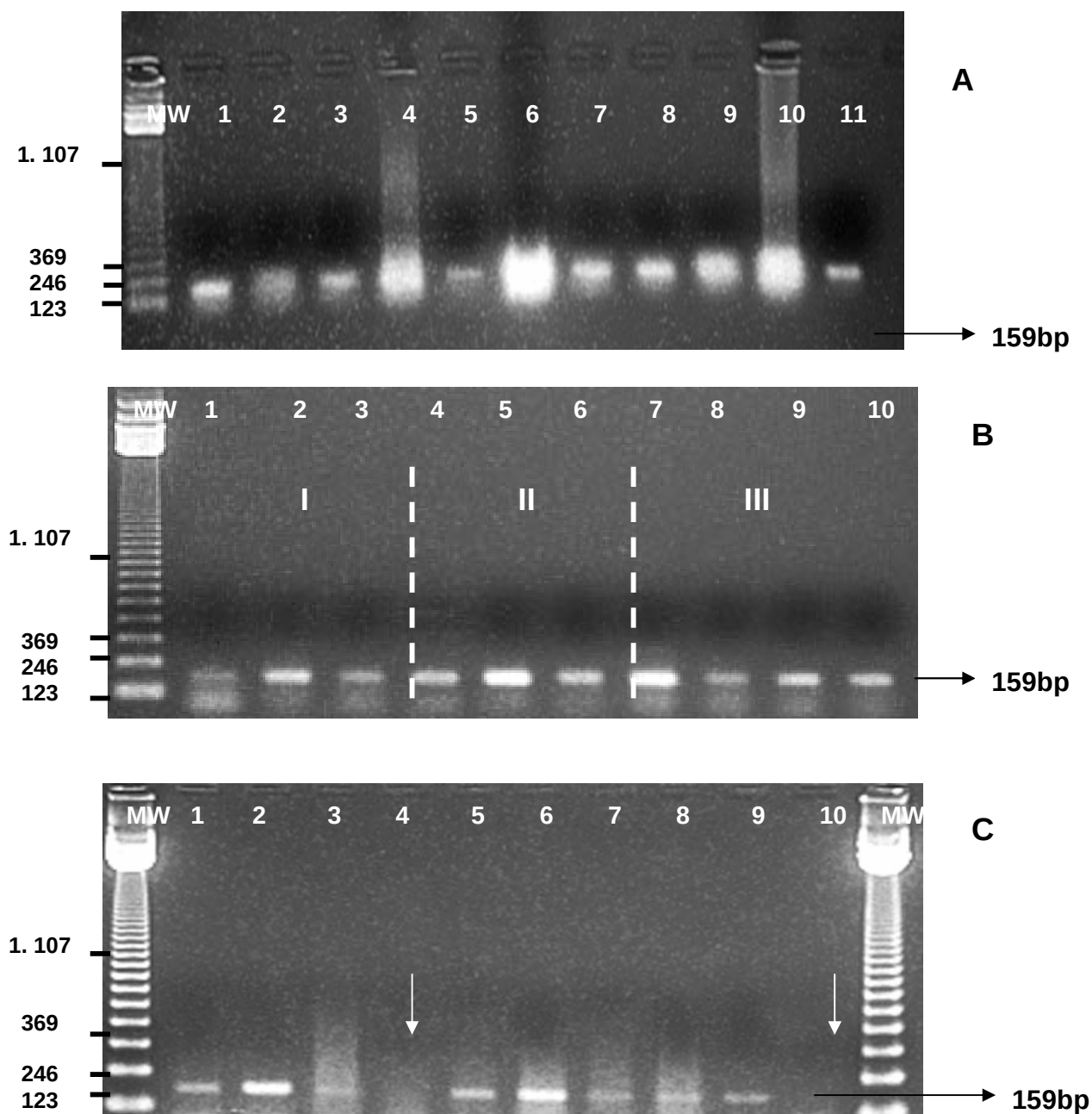


Fig.2. Amplification of BoHV-5 (glycoprotein C encoding gene) from (20) naturally infected cattle, supernatant of infected cells from the 3rd passage and from formalin-fixed, paraffin embedded blocks. Lane MW: 123bp ladder (Invitrogen™, Life Technologies, USA) Panel A: profile of positive results obtained by PCR performed directly from DNA extracted from fresh brain by Easy-DNA™ method (lanes 1-11 showing products of 159bp). Panel B: profile of positive results obtained by PCR performed from the 3rd passage in cell culture, I) MDBK cells (lanes 1-3), II) CRIB cells (lanes 4-6), III) CER cells (lanes 7-10). Panel C: profile of positive results obtained by PCR performed from DNA extracted from formalin-fixed, paraffin embedded samples (lanes 1-3; 5-9 positive; arrowhead showing the negative results).