

DISTRIBUIÇÃO DO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5 EM ENCÉFALO DE BOVINO NATURALMENTE INFECTADO

(Distribution of bovine herpesvirus type 5 in naturally infected cattle brain)

Carla Rosane Rodenbusch^{1*}, Laura Lopes de Almeida¹, Renata Assis Casagrande², Sandra Davi Traverso²

¹Laboratório de Virologia, Centro Estadual de Diagnóstico e Pesquisa em Saúde Animal Desidério Finamor (CEPVDF). Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA). Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR), Programa de Pós-graduação em Saúde Animal (PPGSA), Eldorado do Sul, RS, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias – Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, SC, Brasil.

*Autor para correspondência: carla-rodenbusch@agricultura.rs.gov.br

Editora: Julia Arantes Galvão

RESUMO - Foi investigada a ocorrência de uma doença neurológica em uma criação de gado de corte no município de Joaçaba, Estado de Santa Catarina, Brasil. Os animais apresentaram sinais neurológicos como incoordenação, cegueira, andar cambaleante, salivação e movimento lateral da cabeça. Dois animais foram acompanhados até a morte. Com a morte do primeiro, foi descartada a ocorrência de raiva e a suspeita passou a ser infecção por Herpesvirus bovino. No segundo animal foi realizado exame histopatológico, PCR em tempo real para *Bovine alphaherpesvirus bovino 1 e 5* (BoHV-1 e BoHV-5), isolamento viral e diagnóstico diferencial de raiva. As lesões microscópicas encontradas foram compatíveis com infecção viral e o animal foi positivo para BoHV-5, sendo que cortes do encéfalo foram submetidos a PCR em tempo real para quantificação. As porções do córtex parietal e frontal apresentaram maior carga viral que temporal e occipital. O diagnóstico de raiva, de BoHV-1 e o isolamento viral foram negativos. Esses resultados reforçam a distribuição heterogênea no vírus no encéfalo, já demonstrada experimentalmente, e contribuem para o conhecimento da patogenia da doença.

Palavras-chave: córtex; encefalite bovina; infecção natural; PCR em tempo real.

ABSTRACT - The occurrence of a neurological disease in a beef cattle farm in the municipality of Joaçaba, State of Santa Catarina, Brazil was investigated. The animals showed neurological signs such as incoordination, blindness, staggering gait, salivation, and lateral head movement. Two animals were followed until death. With the death of the first one, the occurrence of rabies was ruled out and the suspicion became an infection by Bovine herpesvirus. In the second animal, histopathological examination, real-time PCR for *Bovine alphaherpesvirus 1 and 5* (BoHV-1 and BoHV-5), viral isolation and differential diagnosis of rabies were performed. The microscopic lesions found were compatible with viral infection and the animal was positive for BoHV-5, and brain sections were submitted to real-time PCR for quantification. The portions of the parietal and frontal cortex had a higher viral load than the temporal and occipital ones. Rabies diagnosis, BoHV-1 and viral isolation were negative. These results reinforce the heterogeneous viral distribution in the brain, demonstrated experimentally in previous works, and contribute to the knowledge of the pathogenesis of the disease.

Palavras-chave - bovine encephalitis; cortex; natural infection; real-time PCR; viral load.

Recebido em 09/08/2021
Aprovado em 06/06/2022



INTRODUÇÃO

Os Alphaherpesvírus bovino (BoHV) tipos 1 e 5 são espécies virais estreitamente relacionadas e associadas a várias manifestações clínicas. De maneira geral o BoHV-1 causa doença respiratória ou reprodutiva e o BoHV-5 causa meningoencefalites, embora ambos possam causar os dois quadros lesionais. Esses vírus têm a capacidade de fazer latência e manterem-se como fonte de infecção para o rebanho (FRANCO et al., 2017).

A forma neurológica associada a encefalite herpética bovina afeta principalmente animais jovens sendo normalmente causada pelo BoHV-5. É uma doença de baixa morbidade e elevada letalidade bastante importante em países do hemisfério sul, principalmente sul do Brasil e Argentina (CARRILLO et al, 1983; Franco et al, 2017). Os sinais observados em infecção natural são depressão, andar cambaleante, bruxismo, protusão da língua, salivação, flexionamento do pescoço, opistótomo, nistagmo, cegueira, pressionamento da cabeça contra anteparos, ataxia, decúbito e convulsões (FRANCO et al, 2017; PEREZ et al, 2002).

A transmissão se dá por contato direto e indireto com animais e secreções contaminados. O vírus penetra pelo trato respiratório superior, replica inicialmente na mucosa nasal, invade os neurônios sensoriais regionais e é transportado através do fluxo axonal retrógrado para o nervo trigêmeo, onde atinge os corpos neuronais. No trigêmeo o vírus pode estabelecer a infecção latente ou seguir para o encéfalo, atingindo os neurônios de segunda ordem nos núcleos da ponte e bulbo. A partir desses sítios, o vírus pode disseminar-se para o cerebelo e tálamo, alcançando o córtex cerebral. Experimentalmente, o vírus pode se distribuir de forma heterogênea pelas áreas do encéfalo (FRANCO et al, 2017).

Uma propriedade localizada no Município de Joaçaba, no meio Oeste de SC apresentou casos de doença neurológica em um intervalo de 3 meses no final de 2016. Descartada a ocorrência de raiva, o objetivo deste trabalho foi demonstrar a distribuição do BoHV-5 no encéfalo bovino, durante uma infecção natural, com o intuito de contribuir com informações para a compreensão da patogenia do vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma fêmea Simental com 7 meses de idade apresentou incoordenação motora, andar a esmo, cegueira e óbito 10 dias após o início dos sinais clínicos. O animal foi necropsiado e foram encaminhadas amostras de SNC, armazenadas em formalina tamponada, para análise histopatológica e amostras refrigeradas para imunohistoquímica para raiva. A suspeita inicial do surto era raiva, mas descartado o

diagnóstico de raiva neste animal, foi investigado um segundo animal e a suspeita passou a ser infecção por Herpesvirus bovino. O próximo animal que adoeceu era um macho da mesma raça com dois anos e um mês. Este bovino apresentou balanopostite 15 dias antes do início dos sinais neurológicos. Os sinais clínicos iniciaram com salivação intensa, no segundo dia evoluiu para trismo e mastigação involuntária, sendo tratado com terramicina. Os sinais progrediram para incoordenação motora e movimentos laterais contínuos de cabeça com morte no quarto dia de evolução clínica. Diante da suspeita de BoHV, partes do encéfalo refrigerado (córtex, tronco e cerebelo) foram encaminhados para PCR em tempo real para BoHV1 e BOHV-5 e isolamento. O córtex foi dividido em porções frontal, parietal, temporal e occipital e submetido as mesmas técnicas. Parte do encéfalo foi encaminhado em formol para exame de histopatologia e metade refrigerado para a realização de imuno-histoquímica (IHQ) para raiva.

Para detecção e quantificação de BoHV-1 e BoHV-5 foi realizada uma multiplex PCR em tempo real (RT-qPCR) (Rodenburg et al, 2020). Para a quantificação, nas diferentes partes do encéfalo, foi construída uma curva padrão com diluições seriadas do DNA de uma cultura padrão de BoHV-5 (ISO95/97). Essa amostra padrão foi previamente titulada em cultivo celular e foram utilizadas as diluições equivalentes a 4×10^4 até 4×10^{-2} doses infectantes em cultivo celular (TCID₅₀/50µL). Após a RT-qPCR os valores de quantificação foram ajustados para TCID₅₀ por grama de encéfalo analisado.

Para o isolamento viral *in vitro* as porções do encéfalo foram maceradas e solubilizadas em Meio Essencial Mínimo com sais de Erle (EMEM, Gibco) na proporção 10% peso/volume. Posteriormente as amostras foram clarificadas por centrifugação a 1200xg por 15 minutos. O sobrenadante foi inoculado em monocamada de células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) ATCC CCL-22 e incubadas a 37°C e 5% de CO₂, por 4 dias. Os cultivos foram realizados em placas de 24 poços e mantidos em EMEM (Gibco) suplementado com 2% de soro fetal bovino, penicilina 200 UI/mL e streptomina 200 µg/mL. O crescimento celular e o efeito citopático compatível com herpesvirus foram monitorados diariamente por inspeção em microscópio óptico. O isolamento foi concluído após 3 passagens consecutivas em cultivo conforme sugerido pela OIE (2018). A cepa referência BoHV-1 COOPER foi utilizada como controle em todas as microplacas.

As amostras em formol foram processadas rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina. A IHQ foi realizada conforme protocolo descrito por Pedrosa et al. (2008), utilizando-se anticorpo poli clonal (Rabies polyclonal Chemicon #5199, Temecula, CA, Estados Unidos) na diluição 1:1000 em PBS (*phosphate buffered saline*). As lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase (LSAB2 Kit, Dako Nort

America, Carpinteria, USA) e reveladas com cromógeno marrom DAB (DAB, Dako Nort America, Carpinteria, USA).

RESULTADOS

A necropsia da fêmea não evidenciou lesões macroscópicas. As lesões microscópicas eram confinadas ao córtex e caracterizavam-se por áreas multifocais extensas de malácia com inúmeras células de Gitter. Em muitas áreas havia desaparecimento completo do tecido cortical normal e infiltrado linfocítico acentuado multifocal perivascular, às vezes associado a hemorragia leve, compatível com encefalite herpética. A IHQ para raiva foi negativa. A necropsia do macho evidenciou fígado pálido e congesto e edema pulmonar. As lesões microscópicas eram mais agudas, caracterizadas por edema perivascular acentuado com necrose neuronal difusa do córtex encefálico, infiltrado de linfócito e raros neutrófilos perivascularres leves nos vasos da substância cinzenta e branca; no complexo estriado havia áreas multifocais de gliose e infiltrado linfocítico perivascular; compatível com encefalite viral. Na RT-PCR foi identificado somente BoHV-5 e o resultado da quantificação do vírus nas diferentes áreas do encéfalo poder ser observada na tabela 1. No isolamento viral *in vitro* não houve efeito citopático compatível com herpesvirus e a IHQ para raiva foi negativa.

Tabela 1 - Resultado da quantificação para BoHV-5 nos cortes de encéfalo.

Tecido	Ct	Quantificação equivalente (TCID₅₀/g)
Córtex, tronco e cerebelo	21,58	1,4 x 10 ⁷
Córtex frontal	23,89	3,6 x 10 ⁶
Córtex parietal	23,21	5,2 x 10 ⁶
Córtex temporal	28,27	2,4 x 10 ⁵
Córtex occipital	30,58	6,0 x 10 ⁴

DISCUSSÃO

No Brasil, encefalite associada ao BoHV-5 em bovinos já foi descrita em diversos estados brasileiros, como Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1989), Paraná (LUNARDI et al., 2009), Rio de Janeiro, Minas Gerais (GOMES et al., 2002; Aquino Neto et al., 2009; Oliveira et al., 2016), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Pernambuco (Oliveira et al., 2014), Paraíba, Rio Grande do Norte (Galiza et al., 2010), Pará (RIET-CORREA et al., 2006), São Paulo (Ferrari et al., 2007;), Mato Grosso do Sul (SALVADOR et al., 1998) e Goiás (De Paula et al., 2005). Em Santa Catarina a encefalite por herpesvírus já for relatada como causadora de morte em bovinos, mas não se tinha informação a respeito de qual tipo de herpesvírus estava envolvido (CAMARGO et al. 2014). Neste trabalho, o diagnóstico de

herpesvírus foi feito pela lesão histológica e pela tipificação através da técnica de PCR reafirmando a importância do BoHV-5 nas encefalites herpéticas bovinas.

Os sinais neurológicos observados nas infecções pelo BoHV-5 são frequentemente défices multifocais e compreendem principalmente disfunções cerebrais e do tronco cerebral (LUNARDI *et al.*, 2009). Opistotono, convulsões, cegueira, mudança de comportamento e ranger de dentes são exemplos de disfunção cerebral. Enquanto alterações do nível de consciência (depressão, sonolência, estupor e coma), e disfunção motora (tetraparesia) são associados aos déficits do nervo craniano e nistagmo e inclinação da cabeça, refletem a disfunção do tronco encefálico (SALVADOR *et al.*, 1998; SANCHES *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2002). As alterações microscópicas observadas são compatíveis com infecção herpética e estavam presentes predominantemente no córtex encefálico, por isso os animais apresentaram sinais como cegueira, mastigação involuntária e incoordenação, além do movimento lateral de cabeça que caracterizaria a lesão no tronco encefálico. As lesões histológicas de meningoencefalite não purulenta, associada a lesões necróticas do córtex cerebral e inflamatórias nas substâncias branca e cinzenta observada foram semelhantes as descritas por outros autores (CARRILO *et al.*, 1983; RIET-CORREA *et al.*, 1989).

A maior carga viral foi detectada quando o córtex, tronco encefálico e cerebelo foram analisados em conjunto. Não tivemos material suficiente para analisar em separado o tronco e o cerebelo. Em animais experimentalmente infectados, o BoHV-5 se distribuiu de forma heterogênea, principalmente no córtex olfatório, tálamo, medula, ponte e nervo trigêmeo durante a infecção primária e no córtex dorso lateral, córtex anterior e olfatório e no nervo trigêmio durante a reativação da latência (Vogel *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2017). Observamos que numa infecção natural o vírus foi detectado de forma heterogênea, em maior quantidade no córtex parietal, seguido do córtex frontal e temporal e em menor quantidade no córtex occipital. Esses resultados reforçam a via de infecção olfatória do vírus descrita em coelhos experimentalmente infectados (Lee *et al.*, 1999) e contribuem para o conhecimento da patogenia viral.

CONCLUSÃO

O BoHV-5 se distribuiu de forma heterogênea pelo encéfalo de bovinos naturalmente infectados e tem maior carga viral no córtex parietal e frontal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- AQUINO-NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J. et al. Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.1, p.1-5, 2009.
- CAMARGO, M.C.; WISSER, C.S.; WICPOLT, N.S. et al. Doenças de bovinos diagnosticadas no Laboratório de Patologia Animal CAV/UEDESC, no período de julho de 2012 a julho de 2014. In: Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, VII., 2014, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Colégio Brasileiro de Patologia, 2014. p. 02.
- CARRILLO, B.J.A.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A. et al. Meningoencephalitis caused by IBR vírus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B**. v.30, p.327-332, 1983.
- COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**. v.32, p.293-298, 2002
- DE PAULA, R.R.; SOUZA, M.A.; COLODEL E.M. et al. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, n.1, p.2, 2005.
- FERRARI, H.F. **Detecção herpesvírus bovino tipo 5 em cortes histológicos e fragmentos de encéfalo congelado pela reação em cadeia de polimerase**. 2007. Botucatu, 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- FRANCO, A.C.; VARELA, A.P.M.; ROEHE, P.M. et al. Herpesviridae. In: Flores, E.F. **Virologia Veterinária**. 2 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2017, p.517-584.
- GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, p.267-276, 2010.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A. et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.217-220, 2002.
- LEE, B.J.; WEISS, M.L.; MOSIER, D. et al. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal of Neurovirology**. v.5, p.474-484, 1999.
- LUNARDI, M.; CLAUS, M.P.; LISBOA, J.A.N. et al. Neurological and Epidemiological Aspects of a BoHV-5 Meningoencephalitis Outbreak. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.52, p.77-85, 2009.

OIE. 2018. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Disponível em <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf> Acesso em: 09/08/2021.

OLIVEIRA, J.S.; ALBUQUERQUE, R.F.; AGUIAR-FILHO, C.R. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos associada ao herpesvirus bovino-5 em Pernambuco – Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.43, p.1-5, 2014.

OLIVEIRA, T.S.; BUL, L.V.; FURTINI, R. Neurological diseases of cattle diagnosed through histopathology in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v.9, p.62-69, 2016.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, M.R.; LEUNDA, F.A. et al. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**. v.39, p.437-444, 2002.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M. et al. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, p.627-632, 2008.

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L. et al. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvirus bovino 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, p.13-16, 1989.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D. et al. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causadas por herpesvirus bovino-5 no estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.26, p.44-46, 2006.

RODENBUSCH, C.R.; FERREIRA, J.C.; CUNHA, D.L.B.W. et al. Molecular evidence of bovine herpesvirus 1 and 5 in cattle with suspected rabies in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.73, 101495, 2020.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, p.76-83, 1998.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L. et al. Doenças do Sistema nervosa central em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.20, p.113-118, 2000.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L., FLORES, E.F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, p.4512-4520, 2003.