

Caracterização clinicopatológica da mamilite aguda em ovelhas lactantes infectadas experimentalmente com o herpesvírus bovino 2¹

Sabrina R. Almeida², Diego G. Diel², Daniel R. Rissi³, Rudi Weiblen²
e Eduardo F. Flores^{2*}

ABSTRACT.- Almeida S.R., Diel D.G., Rissi D.R., Weiblen R. & Flores E.F. 2008. [**Clinic and pathological characterization of acute mammillitis in lactating ewes inoculated with bovine herpesvirus 2.**] Caracterização clinicopatológica da mamilite aguda em ovelhas lactantes infectadas experimentalmente com o herpesvírus bovino 2. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(1):87-94. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: flores@ccr.ufsm.br

Mammillitis caused by bovine herpesvirus type 2 (BoHV-2) is an important disease in dairy herds yet its pathogenesis remains largely unknown. This report describes the reproduction and characterization of acute mammillitis in lactating ewes inoculated with BoHV-2 in the skin of the udder and teats. Five out of eight inoculated ewes developed large plaques, with focal necrosis, small vesicles and crust formation in the inoculated areas. The lesions were first observed on day 4 post-inoculation (pi), progressed in size and severity up to days 7-8pi and subsided progressively thereafter. Infectious virus was isolated from the lesions at days 7 and 8pi. Viral antigens and herpesvirus-like particles were demonstrated by electron microscopy in lesions examined at days 5, 6 and 10pi. Histological findings included epithelial necrosis, erosions and ulcers, and formation of syncytial cells. Intranuclear inclusions bodies in epithelial, syncytial and inflammatory cells and lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate in the dermis were also observed. In a second experiment, seven out of ten lambs inoculated into the nostrils and muzzle developed nasal hyperemia and discharge, vesicles, and erosions in the nose. Infectious virus was isolated from lesions during up to three days and all lambs seroconverted to BoHV-2. Attempts to reactivate the latent infection by dexamethasone administration on day 40pi failed, since virus shedding, clinical recrudescence or seroconversion were not observed. The reproduction of acute infection and mammillitis resembling that occurring in cattle paves the way for the use of sheep to study several aspects of the biology of BoHV-2 infection.

INDEX TERMS: Bovine herpesvirus-2, BoHV-2, mammillitis, sheep, experimental infection.

¹ Recebido em 3 de outubro de 2007.

Aceito para publicação em 16 de novembro de 2007.

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*Autor para correspondência: flores@ccr.ufsm.br

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS.

RESUMO.- A mamilite causada pelo herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) possui importante repercussão sanitária em gado leiteiro de alguns países, mas a sua patogenia permanece pouco conhecida. Este trabalho descreve a reprodução e caracterização da mamilite aguda em ovelhas lactantes inoculadas com o BoHV-2 na pele do úbere e dos tetos. Cinco de oito ovelhas inoculadas desenvolveram extensas placas com necrose focal, pequenas

vesículas e formação de crostas nos locais de inoculação. As lesões foram inicialmente observadas no 4º dia pós-inoculação (pi), progrediram em extensão e gravidade até os dias 7-8pi e posteriormente regrediram. O vírus foi isolado das lesões entre os dias 7 e 8 pi. Antígenos virais e partículas típicas de herpesvírus foram demonstrados por microscopia eletrônica em biópsias de lesões coletadas nos dias 5, 6 e 10pi. Os achados histológicos foram caracterizados por necrose epitelial, erosões e úlceras, com formação de células sinciciais e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na derme. Associadas a essas lesões observaram-se inclusões eosinofílicas intranucleares em células epiteliais, sinciciais e inflamatórias. Em um segundo experimento, 7 de 10 cordeiros inoculados na mucosa nasal desenvolveram hiperemia e descarga nasal, bem como vesículas e erosões no focinho. O vírus foi isolado das secreções nasais por até três dias e todos os cordeiros soroconverteram ao BoHV-2. Tentativas de reativar a infecção latente pela administração de dexametasona no 40º dia pi foram infrutíferas, pois não foram observados re-excreção viral, recrudescência clínica ou soroconversão. Esses resultados demonstram que ovelhas são susceptíveis à infecção experimental pelo BoHV-2 e desenvolvem lesões semelhantes às observadas em casos naturais de mamilitite herpética. Além disso, esses resultados sugerem o uso dessa espécie animal como modelo para o estudo de vários aspectos da biologia da infecção pelo BoHV-2.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvirus bovino-2, BoHV-2, mamilitite, ovinos, infecção experimental.

INTRODUÇÃO

O BoHV-2 é o agente etiológico da mamilitite herpética bovina (*bovine herpetic mammillitis*, BHM), uma doença vesicular e erosiva que afeta o úbere e os tetos de fêmeas bovinas. O vírus pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Simplexvirus* e é estreitamente relacionado com o vírus do herpes simplex humano (HSV-1 e HSV-2) e outros herpesvírus de primatas (Roizman et al. 1992, Ehlers et al. 1999). A ocorrência do vírus foi demonstrada em vários países, incluindo Quênia (Martin & Gwynne 1968), Reino Unido (Johnston et al. 1971), Estados Unidos da América (Dardiri & Stone 1972), Austrália (Turner et al. 1974), Brasil (Alice 1977) e Japão (Imai et al. 2005). Sorologia positiva foi detectada em ruminantes selvagens, cuja participação na epidemiologia da doença ainda é incerta (Plowright & Jesset 1972). A infecção pelo BoHV-2 também tem sido associada a uma doença nodular cutânea generalizada, denominada *Pseudo lumpy skin disease* (Gibbs & Rweyemamu 1977).

Infecções naturais pelo BoHV-2 ocorrem principalmente em novilhas e vacas jovens de primeira lactação, e podem ser subclínicas ou produzirem doença leve (Turner et al. 1976, Scott & Holliman 1984). No entanto, a infecção frequentemente provoca lesões cutâneas doloridas, caracterizadas por eritema, edema, formação de vesículas

e ulcerações. Essas lesões podem variar de pequenas placas a extensas vesículas e úlceras na pele do úbere e dos tetos (Lechtworth & LaDue 1982). Embora a BHM seja uma doença frequentemente benigna e autolimitante, vacas afetadas podem desenvolver importante queda na produção de leite e aumento de suscetibilidade à mastite bacteriana, ou serem descartadas para abate em decorrência de mastite crônica (Lechtworth & LaDue 1982, Wellenberg et al. 2002). Lesões vesiculares também podem se desenvolver no focinho de bezerros lactentes filhos de vacas afetadas pela doença. Ovinos e caprinos são susceptíveis à infecção experimental pelo BoHV-2 (Westbury 1981), mas o papel dessas espécies na epidemiologia da doença ainda não foi investigado.

A patogênese da infecção pelo BoHV-2 não está bem esclarecida, em parte devido às incertezas em relação à rota natural de infecção. A maioria dos estudos epidemiológicos e de patogênese foi realizada nas décadas de 1960, 1970 e 1980, quando o vírus era considerado um agente infeccioso emergente em rebanhos bovinos (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973, Martin & Scott 1979, Castucci et al. 1980, 1982, Westbury 1981, Lechtworth & Carmichael 1982). Devido a essas incertezas, tentativas de reprodução e caracterização da doença foram conduzidas utilizando-se diferentes rotas de inoculação (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973, Westbury 1981). Reprodução experimental de lesões focais semelhantes às descritas em infecções naturais pelo BoHV-2 foi realizada em bovinos (Martin et al. 1969), ovinos e caprinos (Westbury 1981). Lesões cutâneas circunscritas distribuídas difusamente pelo corpo foram observadas após inoculação intravenosa em bovinos e ovinos, entretanto, essa rota de infecção é considerada de importância incerta em infecções naturais (Westbury 1981). Inoculação viral intradérmica no úbere e nos tetos causou lesões semelhantes às observadas em surtos naturais, mas a aplicação do vírus em superfície cutânea intacta ou mesmo após irritação induzida por NaOH não causou doença clínica (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973).

Nas primeiras descrições da BHM na Europa e nos Estados Unidos, observou-se uma evidente ocorrência sazonal da doença durante o outono (Martin et al. 1966, 1969, Lechtworth & LaDue 1982). Evidências epidemiológicas sugeriram que o BoHV-2 pudesse ser transmitido mecanicamente por vetores, principalmente pela mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) (Gibbs et al. 1973), mas tal fato não foi comprovado.

A pele intacta parece ser uma barreira efetiva contra o vírus em infecções experimentais pelo BoHV-2 e o envolvimento da derme é essencial para que lesões mais graves se desenvolvam (Martin et al. 1969). Esses achados argumentariam contra a possibilidade de transmissão viral por máquinas de ordenha ou pelas mãos do ordenhador, porém isso pode ser facilitado se muitas vacas apresentam lesões concomitantemente (Gibbs et al. 1973). A fonte de infecção não é prontamente detectada na maioria dos surtos de BHM e, desde as primeiras des-

crições da doença, sugere-se a participação de vírus originado de reativação espontânea de infecções latentes (Gibbs et al. 1973, Martin & Scott 1979).

Ao contrário de outros alfa herpesvírus de animais e seres humanos, a infecção latente causada pelo BoHV-2 não é bem estudada e muitos aspectos da sua biologia são desconhecidos. A reativação experimental da infecção não tem sido consistentemente demonstrada (Probert & Povey 1975, Turner et al. 1976, Castrucci et al. 1980) e tentativas de recuperação viral em culturas de explante de gânglios de nervos sensoriais não obtiveram sucesso (Lechtworth & Carmichael 1980). Além disso, alguns estudos que demonstraram latência e reativação viral podem ter introduzido dúvidas em função da via intravenosa de inoculação viral (Martin & Scott 1979, Castrucci et al. 1982). Conseqüentemente, os sítios anatômicos em que o vírus pode estabelecer latência permanecem desconhecidos (Lechtworth & Carmichael 1980).

Além do impacto sanitário e econômico em rebanhos leiteiros infectados, da relação genética e antigênica com o HSV-1 (Sterz et al. 1974, Ehlers et al. 1999) e da possibilidade do uso como modelo para o estudo dessa infecção em humanos, o BoHV-2 tem sido incluído como um dos vírus animais a ser usado em estudos de terapia antiviral (Field et al. 2006).

Os objetivos deste trabalho foram reproduzir e caracterizar a mamilita produzida pelo BoHV-2 em ovelhas lactantes e avaliar a utilização de ovinos como modelo para estudo da biologia dessa infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Foram realizadas duas inoculações independentes de BoHV-2 em ovinos. No primeiro experimento, oito ovelhas lactantes foram inoculadas na pele do úbere e tetos. Nesses ovinos, foram observadas as características virológicas, clinicopatológicas e sorológicas da infecção aguda. No segundo experimento, dez cordeiros lactentes foram inoculados nas narinas e monitorados quanto aos aspectos clínicos, virológicos e sorológicos durante a infecção aguda. Tentativas de reativação de infecção latente nos cordeiros foram realizadas no 40º dia pi, pela administração de dexametasona (Dx).

Células e vírus

Todos os procedimentos de amplificação viral, isolamento de suabes, quantificação e soroneutralização viral (SN) foram realizados em uma linhagem de células de rim bovino denominada CRIB (Flores & Donis 1995). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) contendo ampicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L) e nistatina (0,02 mg/L), e suplementadas com 5% de soro eqüino. A cepa de BoHV-2 utilizada foi cedida pelo Dr. Fernando Osorio (Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA). Para a otimização da replicação viral, todos os procedimentos de multiplicação do vírus foram realizados em cultivos celulares mantidos a 33°C (O'Connor 1985).

Infecção experimental de ovelhas lactantes (Exp.1)

Oito ovelhas lactantes negativas para o BoHV-2 na SN foram

inoculadas com a suspensão viral e duas ovelhas permaneceram como controle. A inoculação foi feita na pele do úbere e dos tetos, após uma leve escoriação local por fricção com esponja áspera de limpeza. O inóculo de 2 mL contendo $10^{6.3}$ TCID₅₀/mL de vírus foi uniformemente distribuído na área de pele escoriada, com o auxílio de cotonetes de algodão. Os controles foram inoculados da mesma forma com MEM. Os cordeiros lactentes de seis das ovelhas inoculadas (com exceção daqueles das ovelhas 7 e 8, que foram submetidas à biópsia de pele) e das ovelhas controle, foram mantidos junto com as mães por todo o experimento. A temperatura da superfície das narinas (em quatro áreas), do úbere (duas medidas em cada lado) e dos tetos (duas áreas em cada teto) de três ovelhas inoculadas foi aferida com termômetro Minitemp FS (Raytec, Santa Cruz, CA) e a temperatura média foi calculada para cada área.

Os ovinos foram examinados diariamente em busca de sinais locais ou sistêmicos de infecção. Suabes com material coletado dos locais de inoculação e das lesões foram submetidos a tentativas de isolamento viral em células CRIB, de acordo com protocolos de rotina. As amostras foram consideradas negativas após três passagens de cinco dias cada sem efeito citopático (ECP).

Fragmentos de pele das ovelhas 7 e 8 foram coletados em diferentes fases da doença para exame histopatológico, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e detecção de antígenos por imunofluorescência (FA). Após antisepsia e anestesia local com lidocaína, um fragmento de aproximadamente 5 mm de diâmetro foi coletado de uma placa desenvolvida na pele do úbere da ovelha 8, no 5º dia pi. Adicionalmente, dois fragmentos de pele foram coletados da ovelha 7: um fragmento de uma vesícula no teto no 6º dia pi e uma amostra de crosta no úbere (base do teto) no 8º dia pi. Essas amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, incluídas em parafina, processadas rotineiramente para histopatologia e coradas pela hematoxilina-eosina. As amostras selecionadas foram separadas durante a coleta, fixadas em glutaraldeído a 2,5%, pós-fixadas em tetróxido de ósmio e embebidas em epon. Cortes semifinos foram corados com azul de metileno e desses cortes foram selecionadas regiões que foram coradas com citrato de chumbo e acetato de urânio e examinadas por MET. Antígenos virais foram pesquisados por imunofluorescência direta (FA) em seções de tecido desparafinizadas em xilol e reidratadas em etanol, utilizando conjugado FITC e anticorpos anti-BoHV-2 (651-BDV-8101, NVSL, USDA, Ames, IA, USA).

Amostras de soro coletadas no dia da inoculação e no 28º dia pi foram submetidas a testes de soroneutralização (SN), testando-se diluições crescentes do soro (base 2) frente a uma dose fixa de vírus (100-200 DICC₅₀/cavidade). Células CRIB foram usadas como indicadoras de multiplicação viral. Os títulos virais foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de prevenir a produção de ECP. O soro dos cordeiros lactentes também foi testado por SN no 28º dia pi.

Infecção experimental de cordeiros lactentes (Exp.2)

Dez cordeiros de quatro meses de idade foram inoculados com o BoHV-2 e dois permaneceram como controles. Os cordeiros foram inoculados na mucosa nasal e no focinho com 2 mL de suspensão contendo $10^{5.1}$ TCID₅₀/mL de vírus, sob o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os cordeiros controle foram inoculados com MEM. Os animais foram monitorados clinicamente todos os dias e amostras dos locais inoculados

foram coletadas com suabes até o 12º dia pi e submetidas a isolamento viral em células CRIB. Amostras de sangue para SN foram coletadas no dia da inoculação e no 28º dia pi.

Cinco administrações de dexametasona (Dx) durante cinco dias (0.25mg/kg⁻¹/dia⁻¹/5 dias) foram realizadas nos cordeiros inoculados e controles, a partir do 40º dia pi. Os animais foram monitorados clinicamente e suabes nasais foram coletados para isolamento viral a partir do 14º dia pós-Dx. Amostras de sangue para sorologia foram coletadas no dia da primeira administração de Dx e novamente no 28º dia pós-Dx.

Todos os procedimentos de manejo e experimentação animal foram realizados sob supervisão veterinária, de acordo com as recomendações do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, lei 6.638, de 8 de maio de 1979). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFSM (processo 23081-013798/2006-04).

RESULTADOS

Mamilitite aguda em ovelhas lactantes

A inoculação do BoHV-2 na pele do úbere e dos tetos de 8 ovelhas lactantes resultou em mamilitite clínica em 5 animais (Ovelhas 1, 2, 4, 7 e 8). Nenhum sinal de doença sistêmica foi observado. O isolamento viral das lesões foi obtido apenas da ovelha 1, em dois dias consecutivos (7º e 8º pi). Todas as ovelhas que desenvolveram lesões soroconverteram ao BoHV-2 e apresentaram títulos de 2-32 no 28º pi. Duas das três ovelhas que não apresentaram lesões permaneceram soronegativas (Ovelhas 5 e 6) e a terceira (Ovelha 3) desenvolveu título de 2 na SN. Nenhum dos ovinos controles apresentou excreção viral, lesão ou soroconversão durante o experimento. Um resu-

Quadro 1. Dados virológicos, clínicos e sorológicos da infecção aguda em ovelhas lactantes inoculadas com o BoHV-2 na pele do úbere e dos tetos

Animal no.	Excreção viral ^b	Sinais clínicos					Títulos de SN	
		Dias pi ^a					Dias pi	
		0-4	5	6	7	8	0	28
1	7 (2)	-	-	h ^c ,e ^d ,p ^e	h,e,c ^f	h,e,c	<2 ^g	8
2	-	-	-	h,e,p	h,e,c	h,e,c	<2	16
3	-	-	-	-	-	-	<2	2
4	-	-	-	h,v ^h	h,c	c	<2	2
5	-	-	-	-	-	-	<2	<2
6	-	-	-	-	-	-	<2	<2
7 ⁱ	-	h,p	h,p	h,c	S	-	<2	16
8 ⁱ	-	-	h,p	h,e,p,v	h,e,c	h,e,c	<2	32
C1	-	-	-	-	-	-	<2	<2
C2	-	-	-	-	-	-	<2	<2

^a Pós-inoculação, ^b Dia em que foi detectada a excreção viral (duração), ^c hiperemia, ^d edema, ^e pápula, ^f crosta, ^g anticorpos neutralizantes não foram detectados na mais baixa diluição do soro (1:2), ^h vesícula, ⁱ ovelhas submetidas a biópsia. A identificação original (número dos brincos) dos animais era: brinco 108 (1), 116 (2), 118 (3), 138 (4), 159 (5), sem brinco (6), 126 (7) e 166 (8).

mo dos dados virológicos, clínicos e sorológicos da infecção aguda pelo BoHV-2 está apresentado no Quadro 1.

Cinco ovelhas inoculadas desenvolveram lesões cutâneas em um ou dois tetos ou no úbere. As lesões iniciais foram observadas entre os dias 4-5pi e se caracterizaram por placas hiperêmicas de 0,5-1,5cm em seu maior eixo. Essas lesões apresentaram uma pequena depressão central vermelho-escura, que lhes conferia um aspecto levemente umbilicado (Fig.1). A progressão dessas lesões era

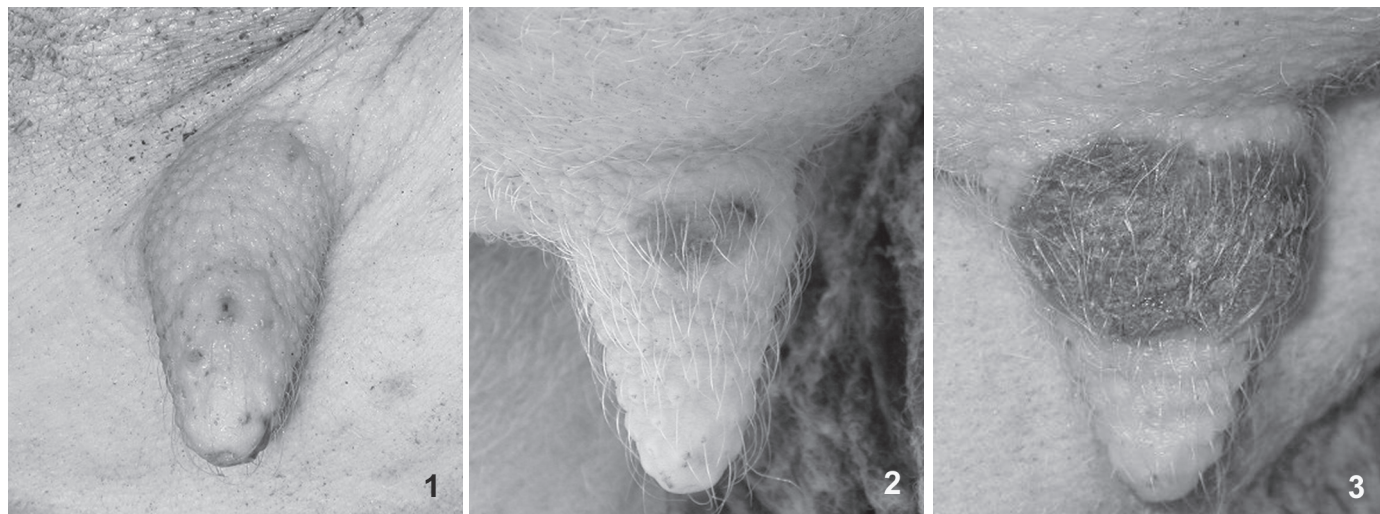


Fig.1. Infecção experimental de ovelhas lactantes com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Teto da ovelha 7 com duas placas hiperêmicas e bem definidas, 6 dias pós-inoculação. Há uma depressão central vermelho-escura que confere um aspecto levemente umbilicado à lesão.

Fig.2. Infecção experimental de ovelhas lactantes com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Área erodida e bem delimitada, circundada por uma área hiperêmica que ocupa a maior parte do teto da Ovelha 1, 7 dias após inoculação. Nessa fase tem início a formação de uma crosta.

Fig.3. Infecção experimental de ovelhas lactantes com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Mesma lesão mostrada na Fig.2, 12 dias pós-inoculação. A lesão ocupa aproximadamente dois terços do teto e é caracteriza por extensa formação de crosta.

evidenciada por áreas hiperêmicas bem definidas, com erosão e início de formação de crostas (Fig.2). Em menos de 24 horas, essas lesões apresentaram ulceração e extensa formação de crostas (Fig.3). Vesículas foram observadas ocasionalmente. A gravidade das lesões foi maior nos dias 7-8pi e reduziu após esse período. Algumas crostas residuais circundadas por um halo vermelho foram observadas até o 12º dia pi.

Os achados histológicos variaram de acordo com a evolução das lesões. Na amostra de uma placa coletada no 5º dia pi havia uma área focalmente extensa de necrose de ceratinócitos separada do restante da epiderme por uma fenda (necrólise) (Fig.4). Em algumas áreas do epitélio eram observadas coleções de neutrófilos entre os ceratinócitos (microabscessos de Munro). Circundando a área de necrose havia um segmento de epitélio com acentuada espongiose e degeneração reticular dos ceratinócitos. Numerosas células epiteliais sinciciais foram observadas associadas às lesões (Fig.5) e havia infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular leve a moderado na derme. Numerosas inclusões eosinofílicas intranucleares (IEIN) intralesionais características de herpesvírus foram observadas em ceratinócitos, células sinciciais e, ocasionalmente, em células inflamatórias (Fig.4 e 5). As lesões observadas em uma amostra coletada no 6º dia pi foram similares às descritas acima, porém com extensas áreas de erosão do epitélio cobertas por restos celulares e lamelas de ceratina. Os ceratinócitos remanescentes apresentaram degeneração balonosa e raras células sinciciais foram observadas. Ocasionais IEIN podiam ser vistas nessa fase. Na derme havia áreas multifocais e coalescentes de acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. A lesão observada no 8º dia pi

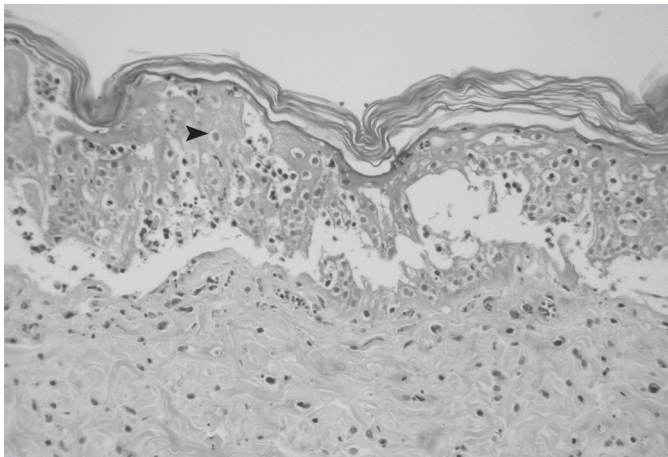


Fig.4. Infecção experimental de ovelhas lactantes com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Lesão desenvolvida pela Ovelha 7, 6 dias após inoculação. Há uma área focalmente extensa de necrose de ceratinócitos com formação de uma fenda na junção dermoepidérmica, evidenciando um processo de necrólise. Numerosas inclusões eosinofílicas intranucleares características de herpesvírus são observadas em células epiteliais (cabeça de seta). HE, obj.20x.

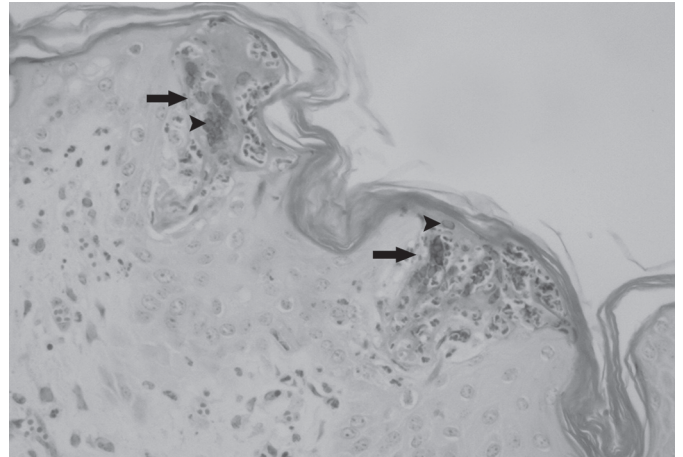


Fig.5. Infecção experimental de ovelhas lactantes com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Mesma lesão mostrada na Fig.4. São observadas numerosas células epiteliais formando sincícios (setas) que apresentam miríades de inclusões eosinofílicas intranucleares (cabeças de seta). HE, obj.40x.

apresentou extensas áreas de ulceração do epitélio cobertas por extensa crosta serocelular. Havia raras IEIN e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário difuso na derme superficial e profunda.

A MET de fragmentos coletados das lesões das Ovelhas 7 e 8 nos dias 6 e 8 pi revelou numerosas partículas virais envelopadas com capsídeo icosaédrico (morfologia típica de herpesvírus) na epiderme (Fig.6). O exame de FA das amostras coletadas durante a biópsia revelou antígenos virais em células sinciciais. Dois cordeiros que mamavam em ovelhas afetadas (Ovelhas 2 e 4) desenvolveram lesões exsudativas e erosivas nos lábios. As lesões foram inicialmente observadas no 11º dia pi e per-

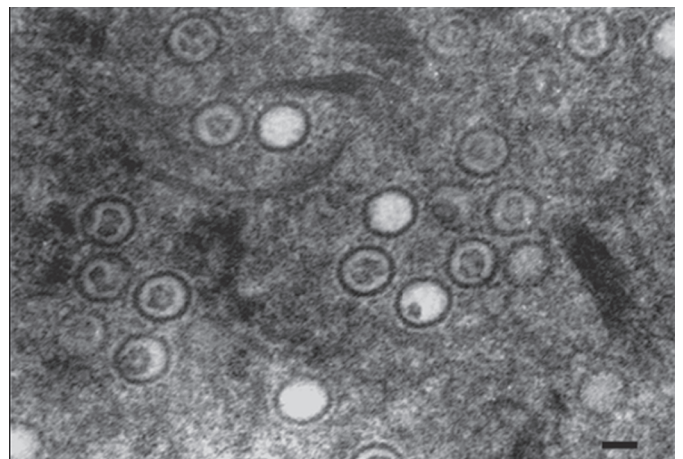


Fig.6. Infecção experimental de ovelhas lactantes com o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de uma lesão desenvolvida no teto da Ovelha 8, 6 dias após a inoculação. Há numerosas partículas virais com capsídeo icosaédrico características de herpesvírus entre restos celulares. Microscopia eletrônica, barra=100nm.

sistiram por 2-3 dias. Tentativas de isolamento viral dessas lesões, no entanto, não tiveram sucesso. Esses e outros cordeiros lactentes em ovelhas afetadas não soroconverteram durante o experimento.

Infecção aguda pelo BoHV-2 em cordeiros

A inoculação do BoHV-2 no focinho dos cordeiros resultou em replicação e disseminação viral e desenvolvimento de lesões vesiculares e erosivas focais em sete dos 10 ovinos (Quadro 2). Excreção viral foi detectada por meio do exame virológico de swabes coletados das lesões entre os dias 2-8pi. Essas lesões tiveram duração de 1-3 dias. Em todos os cordeiros foi observada secreção nasal serosa entre os dias 2-6pi. Essa secreção apresentou característica mucosa ou mucopurulenta conforme a evolução da doença. As lesões foram caracterizadas por áreas hiperêmicas e vesiculares que progrediam para erosões exsudativas no epitélio do focinho. Em alguns cordeiros, as lesões eram revestidas por fibrina. Os sinais iniciaram por volta dos dias 3-4pi e evoluíram até o 8º dia pi, a partir do qual as lesões iniciaram a regressão. Três cordeiros inoculados (Ovinos 11, 12 e 13) desenvolveram leve descarga nasal. Nenhum sinal de doença sistêmica foi observado nos cordeiros durante o experimento e todos os animais inoculados soroconverteram ao BoHV-2 e desenvolveram títulos que variaram de 2-8 no 28º dia pi.

Na tentativa de reativar uma suposta infecção latente, os cordeiros inoculados foram tratados com Dx no 40º dia pi e monitorados clinicamente nos dias seguintes. Não foi observada excreção viral ou soroconversão após o tratamento. Alguns cordeiros desenvolveram leve descarga

nasal serosa por 1-2 dias (Quadro 2). Os dois cordeiros controle permaneceram sem sinais clínicos e soronegativos durante todo o experimento.

A inoculação do BoHV-2 no focinho dos cordeiros resultou em replicação aguda e excreção viral, e aparecimento de lesões nos sítios de inoculação. Tentativas de reativação viral com administração de Dx no 40º dia pi não tiveram resultados positivos.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi descrita a reprodução experimental de mamilita aguda em ovelhas lactantes após a inoculação do BoHV-2 na pele levemente escoriada do úbere e dos tetos. A inoculação do vírus no focinho dos cordeiros, no experimento paralelo, foi seguida de replicação e excreção viral e desenvolvimento de lesões vesiculares e erosivas nos locais de inoculação. A susceptibilidade de ovinos ao BoHV-2 indica o possível uso dessa espécie como modelo para o estudo de vários aspectos da infecção e da doença.

A rota natural de infecção pelo BoHV-2 em bovinos não foi ainda completamente estabelecida. Por esse motivo, a reprodução da infecção e doença clínica geralmente é realizada a partir de diferentes protocolos de inoculação viral: (1) aplicação do vírus na pele dos tetos intacta; (2) inoculação viral após irritação com NaOH; (3) inoculação viral na pele após escarificação com lixa de papel; e (4) inoculação viral na pele exposta à radiação ultravioleta (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973). Nenhum dos experimentos que usaram inoculação na pele intacta resultou em infecção ou lesão, indicando que a pele intacta é uma barreira eficiente contra a penetração do vírus (Martin et al. 1969). Inoculação viral após escarificação cutânea com agulha resultou em leve eritema e edema em alguns animais, porém não levou à formação de vesículas ou soroconversão dos animais (Gibbs et al. 1973). Por outro lado, a inoculação intradérmica resultou em desenvolvimento de lesões clássicas de BHM (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973). Essas observações indicam que a infecção natural pode necessitar de lesão cutânea prévia para que o vírus atinja as camadas profundas da derme e produza doença clínica.

Na tentativa de simular condições naturais de lesão cutânea e facilitar a penetração e replicação do vírus, as ovelhas do presente experimento foram inoculadas após leve escarificação cutânea com esponja áspera de limpeza. Condições naturais também foram simuladas pelo uso de ovelhas lactantes em contato com seus cordeiros lactentes. As lesões desenvolvidas pelas ovelhas inoculadas foram semelhantes (porém menos graves) às descritas em casos de infecção experimental e natural pelo BoHV-2 (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973, Westbury 1981, Lechtworth & LaDue 1982) e se caracterizaram por eritema, placas, erosão ou ulceração, exsudação e formação de crostas. No entanto, o desenvolvimento de vesículas seguidas de ulceração foi observado em apenas duas ovelhas. Esse achado tem sido descrito freqüentemente após inoculação intradérmica de BoHV-

Quadro 2. Dados virológicos, clínicos e sorológicos da infecção aguda e após administração de dexametasona em cordeiros inoculados com BoHV-2 nas narinas e focinho

Animal no.	Infecção aguda				Após Dx ^a (dia 40 pi) ^b			
	Excreção viral ^c	Sinais clínicos	Título na SN ^d (dias pi)		Excreção viral	Sinais clínicos	Título na SN (pós-Dx)	
			0	28			0	28
11	-	sn	<2 ^e	4	-	-	2	2
12	-	sn ^f	<2	8	-	sn	4	4
13	-	sn	<2	2	-	sn	4	4
14	8(1)	sn,v ^g ,e ^h	<2	2	-	sn	2	2
15	5(2)	sn,v,e	<2	8	-	sn	4	4
16	2(2)	sn,v,e	<2	8	-	-	8	8
17	2(3)	sn,v,e	<2	8	-	sn	8	16
18	2(3)	sn,v,e	<2	2	-	sn	4	2
19	3(2)	sn,v,e	<2	8	-	sn	8	16
20	3(1)	sn,v,e	<2	8	-	-	8	16
C1	-	-	<2	<2	-	-	<2	<2
C2	-	-	<2	<2	-	-	<2	<2

^a Dexametasona, ^b Pós-infecção, ^c Dia em que foi detectada a excreção viral (duração), ^d Soroneutralização, ^e Anticorpos neutralizantes não foram detectados na mais baixa diluição do soro (1:2), ^f secreção nasal, ^g vesícula ^h erosão. A identificação original (número dos brincos) dos animais era: brinco 101 (11), 102 (12), 104 (13), 106 (14), 110 (15), 128 (16), 132 (17), 134 (18), 135 (19) e 137 (20).

2 na pele dos tetos em bovinos (Martin et al. 1969, Gibbs et al. 1973) e ovinos (Westbury 1981). Em muitos casos naturais e experimentais, as lesões eritematosas rapidamente ulceraram e formam crostas, sem a formação de vesículas (Martin et al. 1969, Lechtworth & LaDue 1982). Contrastando com a rápida ulceração observada em casos naturais e experimentais de infecção pelo BoHV-2, as lesões eritematosas do úbere e dos tetos das ovelhas observadas no presente estudo desenvolveram depressão central e formaram crostas em menos de 24 horas. O exame histológico demonstrou que as depressões centrais correspondiam a áreas de necrose epidérmica. Achados similares relacionados à evolução das lesões foram descritos em casos naturais de BHM (Lechtworth & LaDue 1982). No presente estudo, não foram observadas ulcerações profundas ou exsudação acentuada nos locais de lesão. Duas ovelhas inoculadas não soroconverteram ao BoHV-2 e esse achado coincide com relatos anteriores, nos quais vacas inoculadas na pele após escarificação desenvolveram leve eritema, mas não soroconverteram (Gibbs et al. 1973). Além de possíveis diferenças de susceptibilidade entre bovinos e ovinos, a rota de inoculação pode influenciar a evolução da doença. A inoculação intradérmica provavelmente possibilita que o vírus alcance as camadas mais profundas da pele, se comparada com a inoculação na superfície cutânea, permitindo altos níveis de replicação viral e lesão tecidual.

O vírus foi recuperado das lesões de apenas uma ovelha, durante o 7º e 8º dia pi. A rota de inoculação e o sítio de replicação podem explicar, parcialmente, a falha na demonstração de infectividade nas lesões na maioria das ovelhas inoculadas. Em outros experimentos, o vírus foi recuperado do fluido vesicular após aspiração com agulha (Martin et al. 1969) ou pressão dos suabes contra a superfície das lesões durante a fase exsudativa (Westbury 1981). No presente estudo as vesículas eram pequenas e rapidamente ulceraram e não foi possível colher o fluido.

Em contraste com a infreqüente recuperação de vírus das lesões desenvolvidas pelas ovelhas, o vírus foi consistentemente isolado durante três dias das lesões do focinho de sete dos 10 cordeiros inoculados. Observações anteriores não apontam para diferenças de susceptibilidade à infecção na pele de diferentes áreas do corpo (Martin et al. 1969), mas a estrutura de cada superfície (epitélio ceratinizado *versus* epitélio de mucosas) e a natureza das lesões (úmida e exsudativa *versus* seca e necrosante) podem explicar as diferenças observadas na replicação e recuperação viral das ovelhas e cordeiros inoculados. Outro fator que pode ter influenciado a replicação viral é a temperatura do tecido. Foi demonstrado experimentalmente (Lechtworth & Carmichael 1984), em vacas infectadas, que a temperatura local possui um importante papel na patogênese da infecção pelo BoHV-2. Os níveis de replicação viral e quantidade de antígenos virais e a gravidade e duração das lesões foram marcadamente maiores nas áreas da pele mantidas en-

tre 3 e 9°C abaixo da temperatura corporal. Sob as circunstâncias do presente experimento (com temperaturas ambientais médias entre 15 e 20°C), diferenças que variaram de 4-7°C entre narinas (27-31°C) e tetos (33,5-35,5°C) foram observadas. Assim, além de diferenças na estrutura e fisiologia das superfícies inoculadas, é possível que variações de temperatura nos tecidos possam ter influenciado a eficiência da replicação e recuperação viral nos locais inoculados (úbere e tetos das ovelhas *versus* focinho dos cordeiros).

A biologia da infecção latente pelo BoHV-2 é de difícil caracterização quando comparada à de outros alfa herpesvírus. Estudos experimentais que tentaram demonstrar e caracterizar a infecção latente pelo BoHV-2 resultaram em achados conflitantes. Replicação e excreção viral após tratamento com corticóides foram demonstradas em bezerros, vários meses após inoculação intravenosa ou intradérmica (Martin & Scott 1979, Castrucci et al. 1982). Outros estudos falharam em induzir reativação viral após administração de corticóides (Probert & Povey 1975, Castrucci et al. 1980) e em recuperar vírus por meio de explantes de mucosa nasal e gânglios de nervos sensoriais (Lechtworth & Carmichael 1980).

No presente estudo, nenhum dos cordeiros inoculados excretou vírus ou soroconverteu após a administração de Dx. O protocolo do tratamento foi essencialmente o mesmo usado previamente para reativação do BoHV-5 em ovinos (Silva et al. 1999) e cabras (Diel et al. 2007) e reativação do BoHV-1 e BoHV-5 em bezerros (Vogel et al. 2003). A não reativação do vírus nos cordeiros inoculados sugere que a reativação do BoHV-2 pode necessitar de estímulos qualitativos e/ou quantitativos diferentes daqueles usados para a reativação de outros alfa herpesvírus. O uso de protocolos alternativos para induzir reativação viral e de técnicas mais sensíveis (por exemplo, PCR) para a detecção de DNA viral poderia contribuir para o entendimento da biologia da infecção latente pelo BoHV-2 e para a identificação de sítios de latência viral. O modelo animal proposto neste trabalho mostrou-se adequado para estudos da biologia da infecção latente pelo BoHV-2. Como o vírus parece replicar mais eficientemente no focinho, essa rota de inoculação deveria ser a selecionada para tal fim.

Os resultados destes experimentos contribuem para a compreensão da patogênese da infecção pelo BoHV-2 e, talvez mais importante, abrem a perspectiva para o uso de ovinos como modelo experimental para o estudo de vários aspectos da infecção aguda e latente pelo BoHV-2.

Agradecimentos.- Ao Dr. Silvano Noal (Biotério Central, UFSM) pelo fornecimento e abrigo aos ovinos durante o experimento e aos estudantes do Setor de Virologia da UFSM pela ajuda no manejo dos animais. Também foram fundamentais o Dr. Claudio Barros (Depto Patologia, UFSM), pelo auxílio nos exames histopatológicos, e o Dr. Severo Sales de Barros (Universidade Federal de Pelotas) pela realização e análise da MET. Os pós-graduandos S.R.A., D.G.D. e D.R.R. são bolsistas do CNPq. (101666/2004-0) e R.W. (301339/2004-0) são bolsistas de produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alice F.J. 1977. Isolamento do vírus da mamilitite herpética bovina no Brasil. *Revta Microbiol.*, São Paulo, 8:9-15.
- Castrucci G., Ferrari M., Frigeri F., Ranucci S., Cilli V., Tesei B. & Rampichini L. 1982. Reactivation in calves of bovid herpesvirus 2 latent infection. *Arch. Virol.* 72:75-81.
- Castrucci G., Frigeri F., Cilli V., Tesei B., Arush A.M., Pedini B., Ranucci S. & Rampichini L. 1980. Attempts to reactivate bovid herpesvirus 2 in experimentally infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 41:1890-1893.
- Dardiri A.H. & Stone S.S. 1972. Serologic evidence of demophatic bovine herpesvirus infection of cattle in the United States of America. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.* 76:156-171.
- Diel D.G., Almeida S.R., Brum M.C.S., Dezengrini R., Weiblen R. & Flores E.F. 2007. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 121:257-267.
- Ehlers B., Goltz M., Ejercito M.P., Dasika G.P. & Lechtworth G.J. 1999. Bovine herpesvirus type 2 is closely related to the primate alphaherpesviruses. *Virus Gen.* 19:197-203.
- Field H.J., Biswas S. & Mohammad I.T. 2006. Herpesvirus latency and therapy, from a veterinary perspective. *Antiviral Res.* 71:127-133.
- Flores E.F. & Donis R.O. 1995. Isolation and characterization of a bovine cell line resistant to infection with the pestivirus bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Virol.* 208:565-575.
- Gibbs E.P., Johnson R.H. & Osborne A.D. 1973. Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Res. Vet. Sci.* 14:139-144.
- Gibbs E.P.J. & Rweyemamu M.M. 1977. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. *Vet. Bull.* 47:411-425.
- Imai K., Ishihara R. & Nishimori T. 2005. First demonstration of bovine herpesvirus 2 infection among cattle by neutralization test in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67:317-320.
- Johnston W.S., Wray C. & Scott J.A. 1971. An outbreak of bovine herpes mammillitis in a suckler herd. *Vet. Rec.* 88:372.
- Lecthworth G.J. & Carmichael L.E. 1980. Bovid herpesvirus 2 latency: failure to recover virus from sensory nerve ganglia. *Can. J. Comp. Med.* 46:76-79.
- Lecthworth G.J. & Carmichael L.E. 1984. Local tissue temperature: a critical factor in the pathogenesis of bovid herpesvirus 2. *Infect. Immun.* 43:1072-1079.
- Lecthworth G.J. & La Due R. 1982. Bovine herpes mammillitis in two New York dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180:902-907.
- Martin W.B. & Gwinne M. 1968. Antibodies to the group II lumpy skin disease virus in the sera of cattle in Kenya. *Bull. Epiz. Dis. Afr.* 16:217-222.
- Martin W.B. & Scott F.M.M. 1979. Latent infection of cattle with bovid herpesvirus 2. *Arch. Virol.* 60:51-58.
- Martin W.B., James H., Lauder I.M., Murray M. & Pirie H.M. 1969. Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 30:2152-2165.
- Martin W.B., Martin B., Hay D. & Lauder I.M. 1966. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet. Rec.* 78:494-497.
- O'Connor M. 1985. Cultivation of bovine herpesvirus 2 by incubation at reduced temperature. *Vet. Rec.* 117:637.
- Plowright W. & Jesset D.M. 1972. Investigation of Allerton-type herpesvirus infection in Esat African game animals and cattle. *J. Hyg.* 69:209-222.
- Probert M. & Povey R.C. 1975. Experimental studies concerning the possibility of a latent carrier state in bovine herpes mammillitis (BHM). *Arch. Virol.* 48:29-38.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123:425-488.
- Scott F.M.M. & Holliman A. 1984. Serum antibodies to bovine mammillitis virus in pregnant heifers. *Vet. Rec.* 114:119.
- Silva A.M., Flores E.F., Irigoyen L.F.C., Weiblen R., Roehe P.M., Sur J.H. & Osorio F.A. 1999. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type 5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet. Microbiol.* 66:89-99.
- Sterz H., Ludwig H. & Rott R. 1974. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine mammillitis virus. *Intervirolog.* 2:1-13.
- Turner A.J., Kovedsy L. & Morgan I.R. 1976. Isolation and characterization of bovine herpesvirus mammillitis virus and its pathogenicity for cattle. *Aust. Vet. J.* 52:166-169.
- Turner A.J., Kovedsy L., Cianter M.S., Nicholls W.A. & Chatham R.O. 1974. Isolation of bovine herpes mammillitis virus from dairy cattle in Victoria. *Aust. Vet. J.* 50:578-579.
- Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkellmann E.R., Mayer S.V. & Bastos R. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41:4512-4520.
- Wellenberg G.J., van der Poel W.H.M. & Van Oirschot J.T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet. Microbiol.* 88:27-45.
- Westbury H.A. 1981. Infection of sheep and goats with bovine herpesvirus 2. *Res. Vet. Sci.* 31:353-357.