

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1: CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS E DA DOENÇA

Autor: Matheus Nunes Weber

Porto Alegre

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1: CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS E DA DOENÇA

Autor: Matheus Nunes Weber

**Monografia apresentada à
Faculdade de Veterinária como
requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina
Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Co-orientadora: M.V. Ângela Oliveira Corbellini**

Porto Alegre

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, Sérgio e Carla, e a meus irmãos, Victor, Gabriela e Isadora, que desde que eu decidi fazer faculdade de Medicina Veterinária, quando eu ainda era criança, me deram apoio e suporte para que eu pudesse realizar esse sonho.

Agradeço à Camila, Rafael, Gabi, Bianca, Débora, Pati, Ana, Paula e Jenny, amigas estabelecidas durante a faculdade, que sempre estiveram comigo nesses últimos 5 anos, e que certamente levarei para o resto da vida.

Agradeço à Luciane, Carine, Bruna, Fernanda, Carla e Renata, pessoas que me ajudaram muito durante o período em que fui bolsista de iniciação científica no Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS, sempre tendo paciência para me ensinar quase tudo que sei hoje, além dos bons momentos de descontração.

Agradeço à minha co-orientadora Ângela por ter me ajudado muito nas minhas atividades no Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS, por ter me auxiliado bastante no desenvolvimento desta monografia e pela amizade.

Agradeço ao meu orientador Cláudio Canal por sempre acreditar em mim e me proporcionar oportunidades e aprendizado durante minha graduação.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas nessa conquista e por todo o apoio dado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática comparada à microscopia eletrônica de um vírion da subfamília <i>Alphaherpesvirinae</i>	15
Figura 2: Organização genômica dos alphaherpesvírus.....	17
Figura 3: Ciclo replicativo dos membros da subfamília <i>Alphaherpesviridae</i>	22
Figura 4: Estabelecimento da infecção latente e reativação da infecção dos membros da subfamília <i>Alphaherpesvirinae</i>	26
Figura 5: Produtos de amplificação do sobrenadante de cultivo celular submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de herpesvírus isolados de bovinos naturalmente infectados.....	15
Tabela 2: Taxonomia completa dos herpesvírus do gênero <i>Varicellovirus</i> e seus hospedeiros naturais.	16
Tabela 3: Principais glicoproteínas do BoHV-1.....	18
Tabela 4: Percentagem de animais soropositivos para BoHV-1 em rebanhos bovinos no Brasil, assinalada por diferentes autores.....	34
Tabela 5: Causas infecciosas de abortamentos em bovinos.	35
Tabela 6: Células susceptíveis para replicação <i>in vitro</i> de BoHV-1.	38
Tabela 7: Seqüências dos oligonucleotídeos e sua localização correspondente na gE de BoHV-1.	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

μL: Microlitro

AIHV-1: Herpesvírus alcelafino tipo 1 ou vírus da febre catarral maligna

AKV: Vírus Akabane

BICP0: *Bovine Infected Cell Protein 0*

BICP4: *Bovine Infected Cell Protein 4*

BICP22: *Bovine Infected Cell Protein 22*

BICP27: *Bovine Infected Cell Protein 27*

BICP47: *Bovine Infected Cell Protein 47*

BLHV: Herpesvírus linfotrópico bovino

BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-1.1: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 1

BoHV-1.2a: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2a

BoHV-1.2b: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2b

BoHV-1.3: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 3

BoHV-2: Herpesvírus bovino tipo 2

BoHV-4: Herpesvírus bovino tipo 4

BoHV-5: Herpesvírus bovino tipo 5

BRSV: Vírus respiratório sincicial bovino

BT: Células de corneto nasal bovino

BTV: Vírus da língua azul

BuHV-1: Herpesvírus bubalino tipo 1

BVDV: Vírus da diarreia viral bovina

CaHV-1: Herpesvírus canino tipo 1

CeHV-9: Herpesvírus cercopitecino tipo 9

CpHV-1: Herpesvírus caprino tipo 1

CRIB: Célula resistente a infecção pelo BVDV

CvHV-1: Herpesvírus cervídeo tipo 1

CvHV-2: Herpesvírus cervídeo tipo 2

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desorribonucleotídeo trifosfatado

EBTr: Células de traquéia de feto bovino

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

EHV-1: Herpesvírus equino tipo 1

EHV-3: Herpesvírus equino tipo 3

EHV-4: Herpesvírus equino tipo 4

EHV-8: Herpesvírus equino tipo 8

EHV-9: Herpesvírus equino tipo 9

ELISA: Ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immuno sorbent assay*)

EUA: Estados Unidos da América

FeHV-1: Herpesvírus felino tipo 1

gB: Glicoproteína B

gC: Glicoproteína C

gD: Glicoproteína D

gE: Glicoproteína E

gG: Glicoproteína G

gH: Glicoproteína H

gI: Glicoproteína I

gK: Glicoproteína K

gL: Glicoproteína L

gM: Glicoproteína M

HCl: Ácido clorídrico

HeLA: Células de linhagem humana

HHV-3: Herpesvírus humano tipo 3

IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFD: Imunofluorescência direta

IgG: Imunoglobulina G

IPB: Balanopostite pustular infecciosa

IPV: Vulvovaginite pustular infecciosa

IPX: Imunoperoxidade

IR: Região interna (*internal region*)

KCl: Cloreto de potássio

kpb: quilopares de bases

LRT: Transcritos relacionados à latência (*latency-related transcript*)

LT: Linfócitos T

LTP: Produtos relacionados à latência (*latency-related products*)

MDBK: Células de rim bovino Madin-Darby

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MHC-I: MHC classe 1

MHC-II: MHC classe 2

MgCl₂: Cloreto de magnésio

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

nm: nanômetro

OHV-2: Herpesvírus ovino tipo 2

OIE: Organização Internacional de Epizootias

PBS: Tampão salino de fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PhoHV-1: Herpesvírus focino tipo 1

pmol: picomol

PI-3: Vírus da parainfluenza tipo 3

REA: Análise por enzimas de restrição

RNA: Ácido ribonucléico

SN: Soroneutralização

SNC: Sistema nervoso central

SuHV-1: Herpesvírus suíno tipo 1 ou vírus da doença de Aujeszki

U: Unidade

UL: Longo único (*unique long*)

US: Curto único (*unique short*)

UV: Ultravioleta

TCID₅₀: *Tissue culture infective dose*

TR: Região terminal (*terminal region*)

VHS: *Virion host shut off*

VP8: *Viral protein 8*

VP16: *Viral protein 16*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.	Histórico	13
2.2.	Características gerais do BoHV-1	14
2.3.	Replicação viral	20
2.4.	Transmissão	23
2.5.	Neuroinvasão, latência e reativação	24
2.6.	Resposta imune	26
2.7.	Falhas reprodutivas	27
2.7.1.	Fase embrionária	28
2.7.2.	Fase fetal	28
2.8.	Outros sinais clínicos	29
2.8.1.	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)	30
2.8.2.	Forma ocular	30
2.8.3.	Vulvovaginite Infecciosa Pustular (IPV)	31
2.8.4.	Balanopostite Infecciosa Pustular (IPB)	31
2.8.5.	Encefalite	31
2.8.6.	Doença sistêmica em neonatos	32
2.9.	Epidemiologia	32
2.9.1.	Situação no mundo	32
2.9.2.	Situação no Brasil	33
2.9.3.	Ocorrência de abortamentos por BoHV-1 frente a outras causas infecciosas e não infecciosas	35
2.10.	Diagnóstico	36
2.10.1.	Diagnóstico clínico	36
2.10.2.	Diagnóstico laboratorial	36
2.11.	Prevenção e controle	40
2.11.1.	Vacinas	41

3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE BOHV-1 EM DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS E SEU USO EM PROPRIEDADES COM BAIXAS TAXAS REPRODUTIVAS.....	44
3.1. Materiais e métodos.....	44
3.1.1. Amostras.....	44
3.1.2. Extração de DNA e PCR.....	45
3.2. Resultados.....	45
3.2.1. Padronização da PCR para detecção de BoHV-1 em diferentes amostras biológicas..	45
3.2.2. Detecção de BoHV-1 em animais naturalmente infectados.....	46
3.3. Discussão.....	46
4. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

Relatos de abortamentos bovinos são extremamente frequentes e apresentam dificuldades na identificação do agente etiológico. Somente 30% a 45% dos casos apresentam diagnóstico etiológico definitivo em virtude das múltiplas causas envolvidas (KIRKBRIDE, 1992; CAMPERO et al., 2003). Além disso, a expulsão do feto pode ser tardia à morte fetal, resultando em autólise e dificultando a identificação e isolamento do agente etiológico (FERNANDES, 1998).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um dos principais patógenos que afeta as criações comerciais de bovinos no mundo, estando associado com a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), conjuntivite, doença sistêmica em neonatos, meningoencefalite e diversas formas de problemas reprodutivos (WYLER et al., 1989). Caso a infecção venha a se tornar sistêmica em animais prenhes, o vírus pode atravessar a barreira do epitélio uterino e causar a morte do concepto, resultando em morte embrionária, fetal ou abortamento.

As altas taxas de soropositividade, em rebanhos bovinos não vacinados, relatadas em trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil (RAVAZZOLO et al., 1989; VIDOR et al., 1995; LOVATO et al., 1995; MÉDICI et al., 2000; TAKIUCHI et al., 2001; DIAS et al., 2008), tornam o BoHV-1 alvo de grande importância na pesquisa da etiologia e dos problemas reprodutivos causados por esse agente.

No presente trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o BoHV-1 e suas implicações como agente causal de falhas reprodutivas, principalmente o abortamento, além da descrição de um experimento que objetivou a detecção de BoHV-1 em animais de propriedades com índices reprodutivos insatisfatórios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

Afecções venéreas em bovinos são relatadas há muito tempo na Europa. No ano de 1894, Büchner e Trommsdorf descreveram problemas no gado que provavelmente tratavam-se de casos de vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IPB), os quais classificaram como *Bläschenausschlag* (exantema coital vesicular). O mesmo problema também foi verificado nos EUA em 1895, o que sugere que a existência de IPV e IPB é anterior a IBR (PASTORET et al., 1982). Somente em 1928, Reisinger e Reimann (apud MUYLKENS et al., 2007) comprovaram que a etiologia destas enfermidades estava relacionada a um agente filtrável.

Na década de 50, nos Estados Unidos, uma forma mais severa do problema foi relatada causando doença respiratória e sendo classificada como *Infectious bovine rhinotracheitis* (Rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR) (SHROEDER; MOYS, 1954; McKERCHER et al., 1954; JENSEN et al., 1955; MILLER, 1955). Esse problema se espalhou rapidamente pela Europa devido a importação de gado, que era realizada com a finalidade de melhorar o desempenho na produção de leite de alguns países (MUYLKENS et al., 2007).

O isolamento viral foi documentado pela primeira vez em 1956, a partir de amostras obtidas de casos de IBR que ocorreram em rebanhos dos EUA (MADIN et al., 1956; YORK et al., 1957). Estes isolados se mostraram sorologicamente idênticos aos isolados de casos de IPV (GILLESPIE et al., 1959; WAGNER; GILLESPIE, 1959; McKERCHER et al., 1959). Posteriormente, o vírus foi reconhecido como um membro do grupo dos herpesvírus (ARMSTRONG et al., 1961).

Nos anos 60, havia a suspeita do agente causal da IBR também estar relacionado a eventos de abortamento, sendo a etiologia confirmada por laboratórios americanos e canadenses (ORMSBEE, 1963; CRANE et al., 1964; McKERCHER; WADA, 1964). Ainda nesta década, o BoHV-1 foi isolado pela primeira vez de casos de conjuntivite e encefalite, podendo este segundo ter como agente o BoHV-5 (ABINANTI; PLUMER, 1961; FRENCH, 1962; BARENFUS et al., 1963).

No Brasil, a presença do BoHV-1 foi registrada primeiramente em 1962, tendo sido isolado pela primeira vez em 1978, a partir de pústulas vaginais de vacas, ambos no Estado da Bahia (GALVÃO et al., 1963; ALICE, 1978). Por sua vez, o primeiro indício de falha

reprodutiva por BoHV-1 no País data de 1978, quando Mueller et al. (1978) conseguiu isolar o BoHV-1 a partir de um rim de feto bovino, coletado em um matadouro de São Paulo.

No Estado do Rio Grande do Sul, a presença do BoHV-1 foi registrada em 1972, porém seu isolamento foi obtido pela primeira vez em 1991 de lesões de IPB de touros (WIZIGMANN et al., 1972; WEIBLEIN et al., 1991). Atualmente, este vírus encontra-se distribuído em quase todo o mundo, com exceção de alguns países europeus, que adotaram com êxito programas de erradicação (ACKERMANN; ENGELS, 2006).

2.2. Características gerais do BoHV-1

O BoHV-1 pertence a família *Herpesviridae*, a qual inclui mais de duzentos vírus isolados de diferentes espécies, incluindo insetos, moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (ROIZMAN; PELLETT, 2001). Esta variedade de hospedeiros evidencia a capacidade de adaptação dos herpesvírus na natureza, assim como sua co-evolução junto a diferentes espécies ao longo do tempo (DAVISON, 2002).

Existem, além do BoHV-1, mais sete diferentes herpesvírus isolados de bovinos (Tabela 1). Todos os membros desta família apresentam morfologia semelhante, nucleocapsídeo icosaédrico com 100-110 nm de diâmetro, consistindo em 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros), DNA fita dupla de aproximadamente 135,3 kpb. Além disso, é circundado por uma zona eletrodensa de material amorfo denominada tegumento e por um envelope lipídico, onde glicoproteínas virais projetam-se da superfície em forma de espículas, sendo as glicoproteínas B, C e D as mais abundantes (THIRY et al., 2007). Essa estruturação do envelope é a responsável por dar forma a um vírion pleomórfico de 120-300 nm de diâmetro (Figura 1) (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

Sua disposição genômica é típica dos herpesvírus do grupo “D”, em que o genoma pode ser dividido em um segmento longo único (UL) de aproximadamente 102 a 104 kpb e um segmento curto único (US) de aproximadamente 10,5 a 11 kpb, flanqueado por regiões repetidas invertidas de aproximadamente 24 kpb, denominadas repetição interna (IR) e terminal (TR) (Figura 2) (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

O BoHV-1 está classificado na subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (Tabela 2) (ICTV, 2007). Os membros dessa subfamília caracterizam-se por apresentarem um ciclo de replicação curto, com rápida disseminação em cultivos celulares e indução de lise nas células infectadas, além da capacidade de estabelecer infecção latente principalmente, mas não exclusivamente, em gânglios nervosos (MUYLKENS et al., 2007).

O genoma do BoHV-1 codifica mais de 70 proteínas, entre as quais 10 a 12 são glicoproteínas do envelope (TIKOO et al., 1995). Estas glicoproteínas desempenham um papel fundamental na interação vírus-célula e estão envolvidas nos diferentes processos do ciclo viral, tais como reconhecimento e adsorção, penetração, disseminação de célula para célula, maturação e liberação do vírus (Tabela 3) (THIRY et al., 2007).

Tabela 1: Espécies de herpesvírus isolados de bovinos naturalmente infectados. Adaptado e modificado de Muylkens et al. (2007).

Vírus	Subfamília	Doença
Bovino como hospedeiro natural		
BoHV-1	<i>Alphaherpesvirinae</i>	IBR IPV/IPV
BoHV-2	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Mamilite herpética Pseudo-dermatite nodular
BoHV-4	<i>Gama herpesvirinae</i>	Metrite
BoHV-5	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Encefalite herpética
BLHV	<i>Gama herpesvirinae</i>	Não determinada
Bovino como hospedeiro acidental		
AIHV-1	<i>Gama herpesvirinae</i>	Febre catarral maligna
OHV-2	<i>Gama herpesvirinae</i>	
SuHV-1	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Doença de Aujeszky

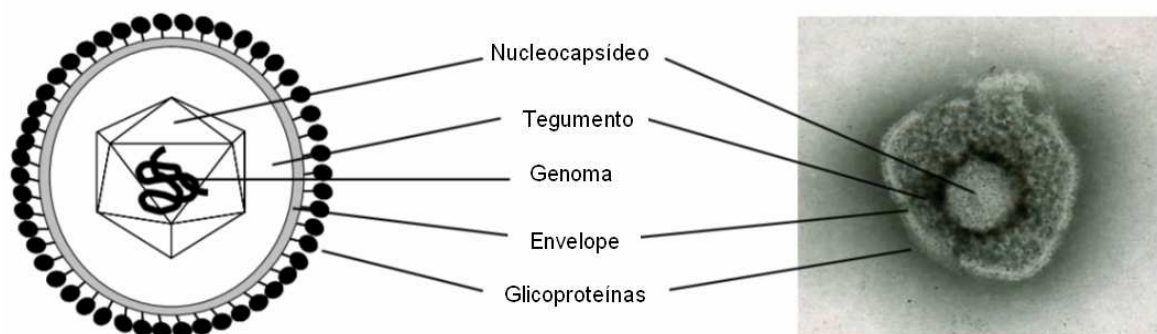


Figura 1: Representação esquemática comparada à microscopia eletrônica de um vírion da subfamília *Alphaherpesvirinae*. Adaptado de Thiry et al. (2006).

Tabela 2: Taxonomia completa dos herpesvírus do gênero *Varicellovirus* e seus hospedeiros naturais. Adaptado de Davison et al. (2009), com modificações.

Taxonomia	Nome	Hospedeiro natural
Ordem	<i>Herpesvirales</i>	
Família	<i>Herpesviridae</i>	
Subfamília	<i>Alphaherpesvirinae</i>	
Gênero	<i>Varicellovirus</i>	
Espécies	BoHV-1	Bovino
	BoHV-5	Bovino
	BuHV-1	Bufálo
	CaHV-1	Canino
	CpHV-1	Caprino
	CeHV-9	Macaco
	CvHV-1	Cervo
	CvHV-2	Rena e alce
	EHV-1	Equino
	EHV-3	Equino
	EHV-4	Equino
	EHV-8	Asinino
	EHV-9	Gazela
	FeHV-1	Felino
	HHV-3	Humano
	PhoHV-1	Foca
	SuHV-1	Suíno

Legenda: BoHV-1: herpesvírus bovino tipo 1; BoHV-5: herpesvírus bovino tipo 5; BuHV-1: herpesvírus bubalino tipo 1; CaHV-1: herpesvírus canino tipo 1; CpHV: herpesvírus caprino tipo 1; CeHV-9: herpesvírus cercopitecino tipo 9; CvHV-1: herpesvírus cervídeo tipo 1; CvHV-2: herpesvírus cervídeos tipo 2; EHV-1: herpesvírus equino tipo 1; EHV-3: herpesvírus equino tipo 3; EHV-4: herpesvírus equino tipo 4; EHV-8: herpesvírus equino tipo 8; EHV-9: herpesvírus equino tipo 9; FeHV-1: herpesvírus felino tipo 1; HHV-3: herpesvírus humano tipo 3; PhoHV-1: herpesvírus focino tipo 1; SuHV-1: herpesvírus suíno tipo 1.

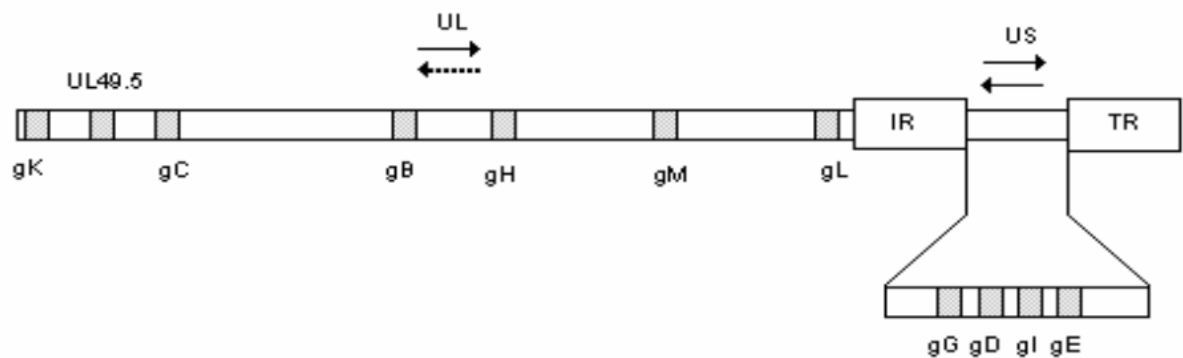


Figura 2: Organização genômica dos alphaherpesvirus. O genoma consiste em uma fita dupla de DNA linear. O rearranjo contém um segmento longo único (UL) e um curto único (US) flanqueado por duas sequências invertidas repetidas: repetição interna (IR) e repetição terminal. O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações enquanto o segmento UL apresenta predominantemente uma orientação (representado pelas flechas; a flecha pontilhada ilustra que a orientação do segmento UL pode variar em torno de 5%). Adaptada de Thiry et al. (2006).

Tabela 3: Principais glicoproteínas do BoHV-1. Adaptada de Esteves (2001), com modificações.

	Glicoproteína	Características
Região UL	gB	Altamente imunogênica; Induz anticorpos neutralizantes; Atua nos processos de adsorção, penetração e difusão.
	gC	Altamente imunogênica; Não essencial para a replicação viral; Durante a adsorção, liga-se aos receptores de heparina; Relacionada a virulência
	gH	Altamente conservada; Atua no processo de entrada, difusão e saída do vírus.
	gK	Participa da fusão do vírus à célula.
	gL	Participa do transporte e da modelagem da gH.
	gM	Participa do processo de difusão célula-célula.
Região US	gD	Altamente imunogênica; Induz anticorpos neutralizantes; Liga-se aos receptores de manose; Induz apoptose.
	gE	Participa da difusão viral; Quando complexada a gI, atua como receptor para a região Fc de IgG.
	gG	Atua na difusão célula-célula.
	gI	Participa do processo de difusão célula-célula Quando complexada a gE, atua como receptor para a região Fc de IgG.

Com relação à resistência da partícula viral, o BoHV-1, assim como todos os membros da família *Herpesviridae*, é considerado frágil e de baixa viabilidade no meio ambiente, sendo assim, as condições de temperatura e produtos químicos utilizados em processos de desinfecção são capazes de eliminar esse agente. Esta característica dos vírions de herpesvírus deve-se principalmente à presença do envoltório lipoglicoprotéico (envelope) (FRANCO; ROEHE, 2007).

As análises genômicas do BoHV-1 com endonucleases de restrição revelaram a existência de quatro subtipos virais: BoHV-1.1, BoHV-1.2a, BoHV-1.2b e BoHV-1.3. De uma forma geral, as cepas de BoHV-1.1 são isoladas de casos de doença respiratória e abortos (*IBR like*), enquanto as cepas de BoHV-1.2 de lesões genitais (*IPV like*). Porém, bovinos infectados experimentalmente pela via respiratória com BoHV-1.2 apresentaram sinais clínicos de doença respiratória (EDWARDS et al., 1991; SPILKI et al., 2004) e estavam aptos a infectar animais controle (EDWARDS et al., 1991; SMITH *et al.*, 1980). Por conseguinte, animais infectados pela via intra-uterina com BoHV-1.1 apresentaram lesões no trato reprodutivo (MILLER et al., 1984). Os subtipos 1.1 e 1.2a foram associados com infecção fetal e casos de abortamento (MILLER et al., 1991), diferentemente do subtipo 1.2b (WHETSTONE et al., 1989; EDWARDS et al., 1990; SMITH et al., 1995).

O BoHV-5, causador de enfermidade neurológica, geralmente fatal em bovinos, anteriormente era classificado como BoHV-1.3 devido às semelhanças com estirpes virais respiratórias e genitais. Além disso, os dois apresentavam cerca de 70% de homologia (DELHON et al., 2003), porém, com base em diferenças no padrão de restrição do genoma, microscopia eletrônica, hibridização cruzada e epidemiologia, houve a proposta de reclassificação. Em 1992, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reclassificou as cepas neurotrópicas como uma espécie viral distinta, denominada BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992). Portanto, a maior diferença entre o BoHV-1 e o BoHV-5 está na capacidade do BHV-5 invadir e replicar-se no SNC, determinando enfermidade neurológica (BAGUST; CLARK, 1972; STUDDERT, 1989; ROIZMAN et al., 1992; BELKNAP et al., 1994).

2.3. Replicação viral

O BoHV-1, assim como os outros membros da família *Herpesviridae*, replicam seu genoma no núcleo da célula hospedeira, utilizando-se de fatores virais e celulares (Figura 3). Apresenta ciclo de replicação curto e geralmente levam à lise da célula infectada, fato que geralmente é o responsável pela sintomatologia clínica local (ENGELS; ACKERMANN,

1996). O vírus penetra principalmente pelas mucosas oro-nasal, genital e ocular. Nas células epiteliais dessas regiões ocorre a replicação e, posteriormente, a disseminação célula-célula, levando a lise celular e produzindo infecção localizada. A infecção sistêmica ocorre quando partículas virais invadem linfonodos e vasos linfáticos seguido de uma viremia associada a linfócitos, monócitos e disseminação pelo organismo (NYAGA; McKERCHER, 1979; ENGELS; ACKERMANN, 1996). Porém, também já foi demonstrada circulação do vírus não associado a células, sendo detectado no soro de animais experimentalmente infectados (KAASHOEK et al., 1996). Cabe ressaltar que ainda existe pouca informação acerca dos mecanismos que determinam a disseminação sistêmica do BoHV-1 (MUYLKENS et al., 2007).

O início da infecção se dá com a ligação das glicoproteínas virais (principalmente gB, gC e gD) aos receptores celulares (principalmente nectina 1 e sulfato de heparina) (TIKOO et al., 1995). A seguir, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, que depende da ação das gB, gD, gH e gL, ocorrendo a penetração do vírus (SPEAR et al., 2000). Após, o nucleocapsídeo chega ao núcleo celular movido pelos microtúbulos celulares (DOHNER et al., 2002).

No primeiro contato com o ambiente intracelular, algumas proteínas presentes no tegumento do vírion têm papel importante: a *viral protein 8* (VP8) atua como um sinal de localização nuclear para o BoHV-1; a *virion host shut off* (VHS) tem a função de bloquear a síntese de proteínas celulares; e a *viral protein 16* (VP16) é responsável por ativar a expressão dos genes alfa (MISRA et al., 1995; HINKLEY et al., 2000; ZHENG et al., 2004).

Dentre as proteínas codificadas pelos genes alfa, cinco denominadas de *Bovine Infected Cell Protein* (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27 e BICP47) ativam a expressão do gene beta, dando sequência a replicação viral (WIRTH et al., 1992; GEISER et al., 2005; JONES et al., 2006; SAYDAM et al., 2006). As beta-proteínas atuam na regulação da transcrição, suprimindo as alfa-proteínas e promovendo a expressão das gama-proteínas. Além disso, atuam no processo de replicação do genoma viral. A expressão dos genes gama é iniciada durante a replicação do DNA viral. As gama-proteínas são requeridas para a síntese da nova progênie viral (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

A montagem dos capsídeos (morfogênese) acontece no núcleo celular, através da interação de determinadas proteínas virais (UL18, UL19, UL35 e UL38). Os capsídeos virais são preenchidos com as moléculas do DNA viral através do auxílio de várias proteínas virais (UL15, UL25, UL26, UL28, UL32 e UL33) (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

O capsídeo, contendo o material genético, migra através da membrana nuclear para tornar-se envelopado. As glicoproteínas virais são traduzidas no retículo endoplasmático rugoso e então transportadas para o aparelho de Golgi em vesículas para continuar o processo de glicosilação. As glicoproteínas são transportadas nas vesículas até a membrana nuclear ou plasmática. O capsídeo viral associa-se com as membranas modificadas pelo vírus, podendo envolver a interação com as proteínas da matriz, codificadas pelo vírus. A liberação final do vírion envelopado da célula envolve o vírus sendo incorporado em vesículas, sendo a seguir, liberado da célula como vírus infeccioso livre. Outra forma de dispersão do vírus pode ser célula-célula, sem contato com o meio extracelular (METTENLEITER, 2002; METTENLEITER et al., 2006).

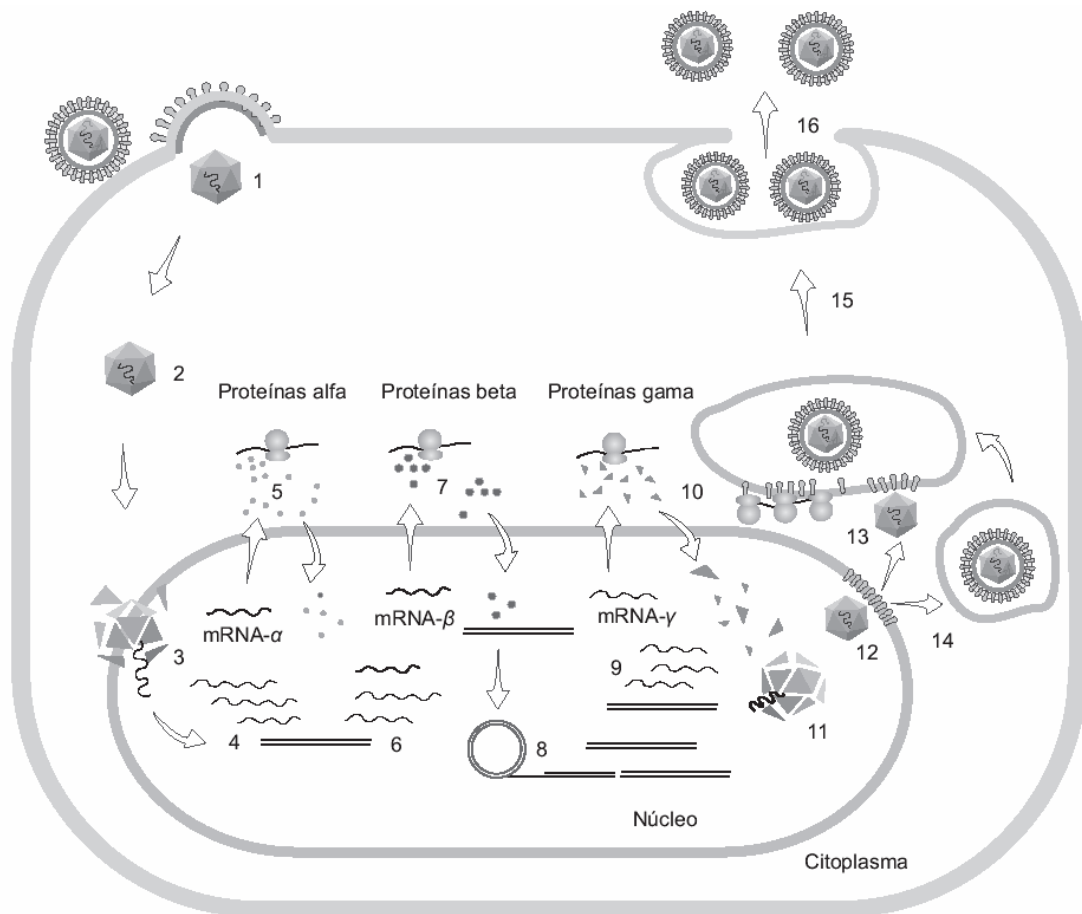


Figura 3: Ciclo replicativo dos membros da subfamília *Alphaherpesviridae*. (1) Fusão do envelope com a membrana plasmática da célula do hospedeiro e penetração do vírus; (2) Transporte do nucleocapsídeo até os poros nucleares; (3) Desnudamento e liberação do genoma viral no interior do núcleo; (4) Transcrição dos genes alfa; (5) Tradução das proteínas alfa; (6) Transcrição dos genes beta; (7) Tradução das proteínas beta; (8) Replicação do genoma; (9) Transcrição dos genes gama; (10) Tradução das proteínas gama; (11) Início da morfogênese; (12) Aquisição do envelope por brotamento através da membrana nuclear; (13) Aquisição do envelope no aparelho de Golgi; (14) Os vírions são enviados em vesículas até o aparelho de Golgi; (15) Transporte dos vírions em vesículas até a superfície celular; (16) Liberação por exocitose. Adaptado de Franco e Roehe (2007).

2.4. Transmissão

As infecções pelo BoHV-1 são transmitidas principalmente através do contato de animais soronegativos com aerossóis, secreções nasais, oculares e genitais de animais infectados (WYLER et al., 1989; MARS et al., 2000). Também há a possibilidade de transmissão indireta, através de fômites, inseminação artificial, transferência de embriões e fetos abortados ou fluidos fetais (WYLER et al., 1989; VAN OIRSCHOT et al., 1993; BIELANSKI; DUBUC, 1994).

Durante a fase aguda da primo-infecção, durante um período de 10 a 17 dias, o BoHV-1 pode ser excretado em secreções nasais em títulos de até 10^{10} TCID₅₀/mL (NANDI et al., 2009). Quando ocorre a reativação da infecção latente, o vírus é eliminado em menores quantidades e por um período mais breve (2 a 7 dias).

O BoHV-1 também pode estar presente no sêmen de touros infectados em títulos de até 10^8 TCID₅₀/mL (STRAUB; MÄCKLE, 1965), sendo descrito como o patógeno viral mais frequentemente encontrado no sêmen bovino (AFSHAR; EAGLESOME, 1990). O vírus pode ser disseminado através da monta natural ou inseminação artificial, sendo a última bastante favorecida pelas técnicas de criopreservação do sêmen, que mantém a infectividade do vírus por longos períodos (ROCHA et al., 1999). A transmissão do BoHV-1 pela inseminação artificial é frequentemente associada a casos de abortamentos em animais infectados naturalmente e experimentalmente (LUKAS et al., 1963; PARSONSON & SNOWDON, 1975; MURRAY, 1990; MILLER et al., 1995; POSPISIL et al., 1996). Foi postulado que o BoHV-1, por replicar predominantemente na mucosa prepucial e na uretra, a contaminação do sêmen ocorre durante a ejaculação, quando o líquido seminal entra em contato com as mucosas infectadas. Essa hipótese foi confirmada por Van Engelenburg et al. (1993) que encontrou mais de 90% de DNA do BoHV-1 em fluido seminal e, praticamente, não foi detectado junto aos espermatozóides.

A transferência de embriões também pode representar um risco de transmissão, visto que o vírus possui receptores tanto em oócitos, quanto na zona pelúcida de embriões. O vírus pode chegar aos líquidos foliculares de animais virêmicos, estando presente em concentrações que podem variar de 10^2 TCID₅₀/mL a 10^9 TCID₅₀/mL, além de infectar os embriões de fêmeas gestantes (BIELANSKI; DUBUC, 1993; ALFIERI et al., 1998). Os embriões que oferecem o maior risco são os que não recebem tratamento com tripsina e os armazenados em nitrogênio líquido em *containers* abertos, visto que o nitrogênio líquido pode estar

contaminado com BoHV-1 e ainda mantém a infectividade do vírus (BIELANSKI et al., 1997; BIELANSKI et al., 2000). Cabe resaltar que o tratamento com tripsina não garante 100% de eficácia na remoção de BoHV-1 (BIELANSKI et al., 1997).

A presença de vírus viável já foi detectada em amostras de leite de fêmeas infectadas, chamando a atenção como fonte de infecção para outros animais (ROBERTS et al., 1974; ESPINASSE et al., 1974; GOURLAY et al., 1974; BILGE, 1998 apud WELLENBERG et al., 2002). Esta variável de herpesvírus está igualmente associada com lesões no úbere de fêmeas com mastite, porém ainda não está confirmado se as lesões primárias foram causadas por esse vírus (GUY et al., 1984).

A espécie bovina é a hospedeira natural do BoHV-1, porém outras espécies apresentam anticorpos reagentes, como búfalos, suínos, caprinos, ovinos, camelos, dromedários e cervos (STRAUB, 2001; NAWAL et al. 2003; INTISAR et al., 2009). Além disso, caprinos, ovinos, bubalinos, cervídeos e renas já foram infectados experimentalmente com sucesso e desenvolveram infecções agudas e latentes (BUONAVOGLIA et al., 1996; HAGE et al., 1997; SIX et al., 2001; MOLLEMA et al., 2005; THIRY et al., 2006; SCICLUNA et al., 2010).

2.5. Neuroinvasão, latência e reativação

Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* podem estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos, onde o DNA viral permanece sob a forma de concatâmeros nos núcleos das células infectadas. O BoHV-1 apresenta capacidade de infectar neurônios e ascender até o sistema nervoso central (SNC), através do fluxo axonal retrógrado, durante a replicação primária, que ocorre nas superfícies de mucosas dos animais contaminados. Com isso, o animal que uma vez for infectado, permanecerá como reservatório e perpetuador desses vírus na natureza, quando houver reativação da infecção (Figura 4) (THIRY et al., 2007).

A mucosa nasal é inervada pelos nervos olfatório e trigêmio. A região rostral é inervada apenas pelo nervo trigêmio, enquanto a região caudal contém terminações nervosas tanto do trigêmio, quanto do olfatório (GERDTS et al., 2000). Essas duas rotas representam os principais caminhos para a neuroinvasão do SNC para alfa herpesvírus como o BoHV-5 e SuHV-1. Porém, o BoHV-1 usa preferencialmente a rota do nervo trigêmio na mucosa nasal, e do nervo sacral na mucosa genital (JONES, 2003; METTENLEITER, 2003).

Apesar da neuroinvasão se restringir ao gânglio local onde acaba estabelecendo a infecção latente, o BoHV-1 tem sido isolado de bovinos com desordens do SNC (D'OFFAY et al., 1993; HORIUCHI et al., 1995; ROELS et al., 2000; SILVA et al., 2007). Porém,

Muylkens et al. (2007) relataram que afecções do SNC causadas pelo BoHV-1 ocorrem devido às diferenças individuais na susceptibilidade do hospedeiro e que isolados neurotrópicos não apresentam diferença no padrão de restrição de seu DNA quando comparados a isolados que não chegaram ao SNC.

O estabelecimento de infecções latentes também já foram relatados em sítios não neuronais. De acordo com Winkler et al. (2000) há evidências de que o BoHV-1 e outros alfa herpesvírus podem estabelecer infecção latente nos centros germinativos das tonsilas faríngeas. Além disso, o vírus foi detectado em linfócitos T CD4+, em células mononucleares periféricas do sangue, gânglios linfáticos e baço (MWEENE et al., 1996; FUCHS et al., 1999; WINKLER et al., 2000).

Após a entrada do vírus na célula, o genoma viral é conservado dentro do núcleo do neurônio, sem produção de vírus infeccioso (DECMAN et al., 2005) e com a expressão dos genes virais extinta, com exceção dos transcritos relacionados à latência (LRT) (HENDERSON et al., 2004). Sendo assim, são produzidos produtos relacionados à latência (LTP), que apresentam funções inibitórias na apoptose, na entrada da célula na fase S e na expressão da BICP0 (SCHANG et al., 1996; CIACCI-ZANELLA et al., 1999; GEISER et al., 2002). É importante ressaltar que a manutenção da latência é definida como um período em que as partículas virais infecciosas não são detectadas por procedimentos padrões de isolamento viral.

A reativação da infecção latente pode ser desencadeada devido a fatores de estresse como, por exemplo: transporte, desmame, descorna, parto, carências nutricionais graves, excesso de trabalho ou ocorrência de infecções, ou até mesmo pela administração de fármacos imunodepressores, como, corticóides (THIRY et al., 1985; THIRY et al., 1987; MUYLKENS et al., 2007). Do corpo do neurônio, os capsídeos são transportados de forma anterógrada até alcançar a extremidade axonal ligada à célula mucosa, onde ocorrerá a montagem e liberação viral (SMITH et al., 2001; ENQUIST et al., 2002). Essa reativação ocorre somente em uma pequena proporção de neurônios (JONES et al., 2006).

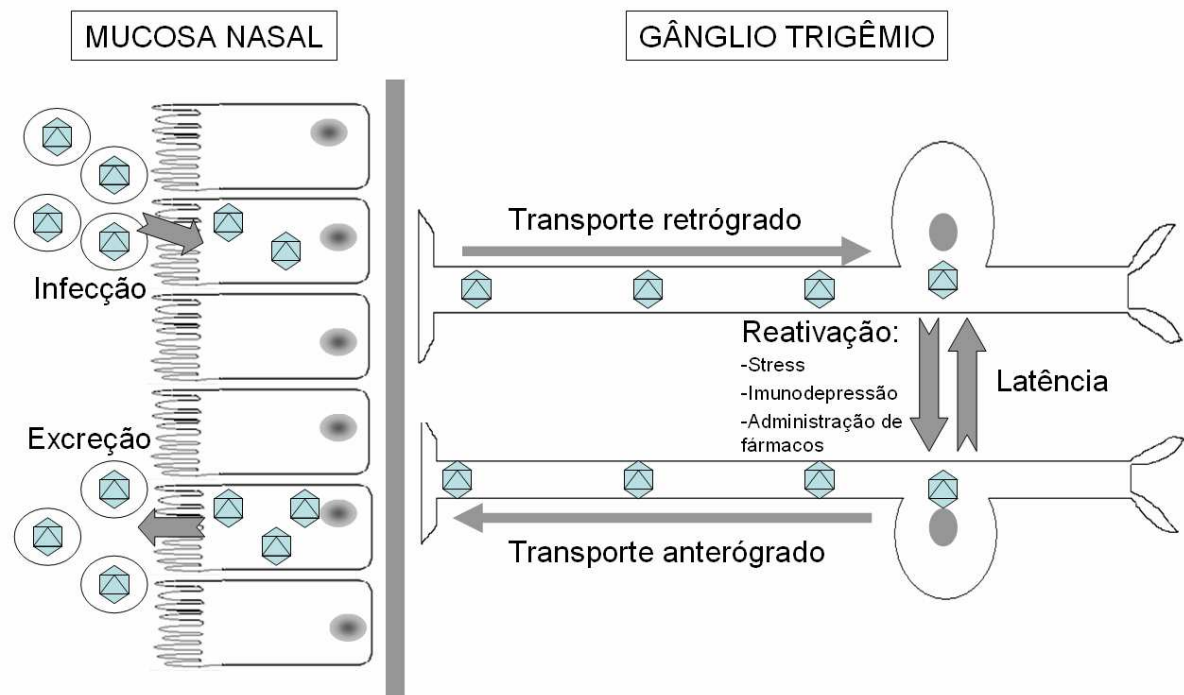


Figura 4: Estabelecimento da infecção latente e reativação da infecção dos membros da subfamília Alphaherpesvirinae. Após a replicação primária, os nucleocapsídeos são transportados pelo fluxo axonal retrógrado até os corpos neuronais localizados nos gânglios sensoriais e autonômicos. Nestes neurônios, o vírus replica ou estabelece infecção latente. Sob condições de estresse ou imunodepressão, a infecção latente pode ser reativada e resulta em replicação produtiva. Os vírions produzidos são transportados de volta aos locais de replicação primária, onde replicam e são excretados.

2.6. Resposta imune

Durante a infecção primária, a síntese de proteínas virais induz uma série de eventos que estimulam a imunidade inespecífica do hospedeiro (BABIUCK et al., 1996). A resposta imune inespecífica consiste na primeira tentativa de defesa do hospedeiro, tendo como objetivo eliminar ou amenizar a infecção viral. Nesta fase, ocorre a produção e liberação de interferon, que modula o transporte de leucócitos e de outras células efetoras, como as células mononucleares periféricas, macrófagos e células *natural killers*, ao local da infecção (BABIUCK et al., 1996). Neste local, neutrófilos e macrófagos liberam óxido nítrico, metabólitos do ácido aracdônico e enzimas para eliminar partículas virais e células infectadas (CAMPOS et al., 1986; CAMPOS et al., 1989).

A resposta imune específica é também ativada na infecção primária, sendo a resposta imune humoral detectada a partir do sétimo dia pós-infecção, persistindo por vários anos (WYLER et al., 1989; BABIUK et al., 1996). A produção de anticorpos contra o BoHV-1 parece ter menos importância na fase inicial da infecção, pois o pico ocorre quando o hospedeiro já se encontra em recuperação. O papel da resposta humoral é questionável, na infecção primária, pois ele parece não participar da disseminação viral célula a célula, uma vez que o vírus apresenta mecanismos de escape e persiste mesmo na presença de anticorpos neutralizantes (WYLER et al., 1989; BABIUK et al., 1996). Porém, numa infecção secundária ou numa reativação viral, a imunidade humoral auxilia prevenindo a infecção, pois os anticorpos exercem maior atividade nas partículas virais extracelulares (BABIUK et al., 1996; MUYLKENS et al., 2007). Anticorpos neutralizantes permanecem circulantes por vários anos após o primeiro contágio (MECHOR *et al.*, 1987; VAN DER POEL *et al.*, 1995). No caso de uma reativação viral, os níveis de anticorpos podem ou não sofrer alterações (MADICK *et al.*, 1995).

A resposta imune mediada por células é detectada entre os 7-10 dias pós-infecção, com a ativação de linfócitos T (LT). Os LT exercem citotoxicidade pelo reconhecimento de epítomos virais, como os epítomos das gB, gC, gD, gE, gI e gG, associados à moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície das células infectadas, causando lise destas (DENIS et al., 1994; BABIUK et al., 1996; MACHADO et al., 2004). LT CD8+ reconhecem epítomos virais associados a proteínas de MHC-I e LT CD4+ a epítomos associados ao MHC-II, enquanto os linfócitos CD4+ contribuem com as células B na produção de anticorpos (ESKRA; SPLITTER, 1997; WANG; SPLITTER, 1998; MACHADO et al., 2004).

2.7. Falhas reprodutivas

A gestação de bovinos tem duração de 280 a 290 dias e considera-se, de maneira geral, que a fase embrionária compreende os primeiros 45 dias de gestação, a fase fetal o período posterior até o dia 270 e o período final é a fase neonatal (LAWRENCE; FOWLER, 1997). Esses conceitos serão considerados para uma melhor compreensão dos temas a seguir.

Fêmeas prenhes que se infectam com o BoHV-1 podem sofrer infecção sistêmica. Isso provavelmente ocorre se as partículas virais invadirem os linfonodos e vasos linfáticos, ocorrendo, então, viremia associada principalmente a linfócitos e monócitos, ocorrendo disseminação pelo organismo (NYAGA; McKERCHER, 1980; ENGELS; ACKERMANN, 1996). Com isso, o vírus pode vencer a barreira do epitélio uterino e matar o concepto,

gerando morte embrionária ou fetal (TAKIUCHI et al., 2005). Porém, cabe ressaltar que ainda existe pouca informação acerca dos mecanismos que determinam a disseminação sistêmica do BoHV-1 (MUYLKENS et al., 2007).

Fêmeas durante o estro também podem apresentar problemas se tiverem infecção sistêmica. Nesse caso ocorre o processo de endometrite necrosante, com tendência de resolução entre uma a duas semanas, gerando infertilidade temporária (MILLER, 1991). Quando a infecção acontece próxima ao período de ovulação, os ovários são particularmente comprometidos e a replicação viral nessas estruturas determinará o desenvolvimento de um quadro de ooforite com necrose e hemorragias por todo o ovário, principalmente no corpo lúteo, com conseqüente queda na concentração de progesterona e falha na prenhez. O ciclo estral seguinte poderá ser normal para a maioria dos animais, porém, há possibilidade de ser observado atraso de até dois meses em uma pequena proporção dos animais (MILLER; VAN DER MARTIN, 1986; SPIRE et al., 1995).

2.7.1. Fase embrionária

O BoHV-1 pode determinar mortalidade embrionária já a partir do sétimo dia pós-fertilização. Até esse período, os embriões estão protegidos pela zona pelúcida que apresenta receptores para o vírus (ALFIERI et al., 1998). Com a perda da zona pelúcida, o embrião fica susceptível e a mortalidade de embriões precoces pode ser causada pela própria atividade citotóxica do BoHV-1 nas células embrionárias, ou mesmo por alterações fisiopatológicas no ambiente uterino, que são incompatíveis com o desenvolvimento normal do feto (MILLER; VAN DER MARTIN, 1986; MILLER, 1987; SPIRE et al., 1995).

Até o décimo quinto dia de gestação, a mortalidade embrionária determina o retorno ao cio em intervalos regulares. Embriões mortos após esse período são igualmente eliminados e as fêmeas apresentam ciclo estral com intervalos irregulares (KASTELIC, 1994).

2.7.2. Fase fetal

Abortamentos causados pelo BoHV-1 podem ocorrer entre 2 semanas a 2 meses após doença causada pelo vírus, ou ainda, após a vacinação de fêmeas prenhes com vacinas modificadas (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977; MUYLKENS et al., 2007). Nos casos de infecção natural, de 25% a 60% dos animais gestantes podem abortar, geralmente no terceiro trimestre da gestação (RIET-CORREA et al., 1996; BROWER et al., 2008).

Após o início da infecção fetal, a morte do feto ocorre entre 24 e 48 horas, mas sua expulsão é adiada por até sete dias. O feto morre devido a infecção sistêmica, que gera danos

viscerais severos, principalmente no fígado, pulmões, baço, rins e timo, além da diminuição gradual da circulação placentária e degeneração da placenta (KENNEDY et al. 1964; MOLELLO et al., 1966; SMITH et al., 1989). Retenção placentária e degeneração dos cotilédones são bastante comuns em fêmeas que abortam fetos em avançado estágio de autólise (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977). Após o aborto, os títulos virais variam muito, diminuindo no feto devido à autólise e mantendo-se estável ou até aumentando na placenta (KENDRICK; STRAUB, 1967).

A autólise pode mascarar algumas lesões fetais, mesmo não havendo lesões macroscópicas patognomônicas, porém por ocorrerem com alta frequência, são altamente sugestivas de abortamento induzido por BoHV-1 (ALFIERI et al., 1998). Pode ocorrer necrose focal, visualizada macroscopicamente como pontos esbranquiçados de 1 a 3 mm de diâmetro no fígado e pulmões, edema serosanguinolento perirrenal, necrose massiva no córtex renal e hemorragia (KENNEDY et al. 1964; OWEN et al., 1964; KENDRICK, 1973). Histologicamente são observados focos de necrose de coagulação multifocal com pouco infiltrado inflamatório no fígado, adrenal, rins, intestinos, linfonodos, pulmões e baço (KENNEDY et al., 1964). Corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser visualizados no fígado, rins e adrenais (RIET-CORREA et al., 1996). Brower et al. (2008) relatou casos de abortamentos causados por BoHV-1 em que os fetos apresentavam encefalite não-supurativa, porém, esta não é uma alteração patológica muito comum em mortes fetais por este agente.

O vírus também está presente na placenta, mesmo sem haver lesões em alguns casos, o que sugere que a degeneração deste órgão é secundária às lesões no feto (MOLELLO et al., 1966; KENDRICK et al., 1971). A lesão macroscópica mais comum é o edema, principalmente na interface uteroplacentária. Histologicamente é observado marcado edema no estroma e região perivascular, necrose e descamação de células endoteliais, e necrose de coagulação nas vilosidades coriônicas (MOLELLO et al., 1966).

2.8. Outros sinais clínicos

O BoHV-1, além de causar problemas reprodutivos, apresenta uma variedade de possíveis apresentações clínicas, como: forma respiratória, genital, ocular, nervosa e infecção sistêmica de neonatos. Enterite e dermatite são sinais menos usuais causados pelo vírus (ELGELS; ACKERMANN, 1996). O período de incubação é de, geralmente, 10 a 20 dias em condições naturais (NANDI et al., 2009).

A maioria das infecções causadas pelo vírus apresenta-se de forma subclínica e a severidade da doença dependerá da virulência da cepa, imunidade do hospedeiro e presença

de infecções concomitantes (MUYLKENS et al., 2007). Em países onde a infecção pelo BoHV-1 é endêmica, podem ser observados quadros clínicos mais discretos devido a ingestão do colostro que confere proteção eficaz contra os sinais clínicos (MECHOR et al., 1987; LEMAIRE et al., 2000; MUYLKENS et al., 2007).

Doença respiratória e genital concomitantes são bastante incomuns (McKERCHER; WADA, 1964), sugerindo que o vírus permanece localizado no sítio de infecção primário, com latência no gânglio neuronal da região (HOMAN; EASTERDAY, 1983; ACKERMANN; WYLER, 1984).

2.8.1. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

A IBR é a forma clássica das síndromes provocadas pelo BoHV-1. Pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou grave, com alta morbidade e baixa mortalidade (NANDI et al., 2009). Geralmente, é caracterizada por hipertermia (40,5-42° C), inapetência, descarga nasal, taquipnéia e dispnéia, tosse, depressão e queda brusca na produção de leite em vacas leiteiras (HAGE et al., 1998; MEYER et al., 2001; NANDI et al., 2009). Pela dificuldade na respiração, os animais tendem a respirar pela boca, levando a salivação profusa.

A mucosa nasal pode se apresentar hemorrágica e com lesões vesiculares a erosivas. As erosões podem ser transitoriamente recobertas com membranas fibrinosas, que se removidas, dão um aspecto hiperêmico a cavidade nasal, de onde a IBR recebeu o apelido de *red nose* (nariz vermelho).

Casos agudos sem complicação, geralmente, regridem em 5 a 10 dias (FENNER et al., 1993; MEYER et al., 2001). Porém, a enfermidade pode complicar-se com infecções secundárias, tanto bacterianas, quanto virais, gerando um aumento nas taxas de mortalidade. Os agentes secundários envolvidos podem ser o BVDV, PI-3, BRSV, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (YATES, 1982).

2.8.2. Forma ocular

Geralmente, durante a doença respiratória, os animais também podem apresentar conjuntivite unilateral ou bilateral. A enfermidade é caracterizada por lacrimejamento profuso, fotofobia e epífora, com os pêlos abaixo dos olhos ficando bastante sujos. Em casos mais graves, também pode ocorrer eversão das pálpebras. Infecções secundárias são bastante comuns, com aparecimento de pus na descarga lacrimal, neste caso a córnea, que normalmente não é afetada, pode apresentar ceratite e ulceração deixando cicatrizes permanentes (MURPHY et al., 1999; TURIN; RUSSO, 2003; NANDI et al., 2009).

2.8.3. Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV)

Fêmeas infectadas com BoHV-1 por via vaginal podem desenvolver IPV, uma enfermidade caracterizada pela presença de pústulas, intumescimento vulvar e descarga mucopurulenta. Os animais afetados apresentam febre, depressão, anorexia e micção freqüente e dolorosa. Devido à dor, o animal geralmente mantém a cauda um pouco elevada para evitar o contato com a vulva que se apresenta inchada e hiperêmica, com pústulas de cerca de 1 a 2 milímetros de diâmetro. Essas pústulas coalescem formando uma pseudomembrana que tende a cobrir a mucosa. Apesar de muitos casos serem subclínicos, o estágio agudo da doença dura de 4 a 5 dias, sendo que as lesões tendem a cura em 10 a 14 dias (PASTORET et al., 1982).

Importante ressaltar que sêmen contaminado com BoHV-1 é um dos principais causadores de IPV, além de poder causar cervicite com descarga mucopurulenta e endometrite (NANDI et al., 2009).

2.8.4. Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB)

Bovinos machos podem desenvolver IPB de forma clínica ou subclínica. O touro pode se contaminar tanto pela monta natural quanto pelo uso de vagina artificial contaminada. Após 1 a 3 dias de incubação, as mucosas do prepúcio e pênis tornam-se hiperêmicas, surgindo pontos avermelhados que tendem a formar pápulas, vesículas e pústulas. Além disso, o animal pode apresentar micção freqüente e incapacidade de monta (WEIBLEN, 1992). Estas lesões podem coalescer formando placas, úlceras e infecções bacterianas secundárias, resultando em uma descarga prepucial mucopurulenta e até hemorrágica (VAN OIRSCHOT et al., 1995). As lesões nos touros perduram por mais tempo do que nas fêmeas, sendo que os nódulos hiperêmicos podem ser vistos até 1 mês pós-infecção (ALFIERI et al., 1998).

O BoHV-1 replica predominantemente na mucosa prepucial e na uretra, contaminando o sêmen durante a ejaculação (VAN ENGELBURG et al., 1993). Cabe ressaltar que a IPB também é acompanhada de uma diminuição brusca da qualidade do sêmen, através da redução da mobilidade e aumento de anormalidades morfológicas dos espermatozoides (MEYER et al., 2001).

2.8.5. Encefalite

Casos de encefalite por BoHV-1 são idênticos aos observados na infecção por BoHV-5 e caracterizam-se por incoordenação motora que evolui para ataxia, tremores, opistótono,

cegueira, convulsões e morte (FURUOKA et al., 1995, ROELS et al., 2000, PENNY et al., 2002; SILVA et al. 2007). Ao contrário de outros alfa herpesvírus neurotrópicos, como o BoHV-5 e o SuHV-1, o BoHV-1 causa encefalite esporadicamente (D'OFFAY et al., 1993; HORIUCHI et al., 1995; ELY et al., 1996; ROELS et al., 2000).

2.8.6. Doença sistêmica em neonatos

Bezerros que receberam pouco colostro estão expostos a maior risco e podem sofrer uma doença sistêmica devido à infecção congênita ou pós-natal (HIGGINS & EDWARDS, 1986; MECHOR et al., 1987; BRYAN et al., 1994). Salivação excessiva e diarreia são sintomas bastante comuns, com os animais vindo a óbito em 4 a 5 dias. Também podem ser observadas lesões no trato digestivo, como glossite, esofagite e ruminite necrótica (MUYLKENS et al., 2007).

2.9. Epidemiologia

O BoHV-1 está presente em plantéis de bovinos de praticamente todo o mundo, com as taxas de prevalência variando consideravelmente de uma região para outra (ACKERMANN; ENGELS, 2006). Além de bovinos, inquéritos sorológicos já revelaram presença de anticorpos reagentes em outros ruminantes domésticos, como búfalos, caprinos, ovinos e ruminantes selvagens (TEIXEIRA et al., 1998, STRAUB 2001; NAWAL et al. 2003; INTISAR et al., 2009).

Muitos estudos têm tentado identificar fatores de risco para a infecção por BoHV-1 e sua introdução nos rebanhos. Alguns deles ressaltaram principalmente a idade, sexo (machos são mais frequentemente positivos que fêmeas) e tamanho do rebanho (SOLIS-CALDERON et al., 2003; BOELAERT et al., 2005). Contato direto de animais, como troca de reprodutores e participação dos animais em exposições também são fatores importantes (VAN SCHAIK, 2001; VAN SCHAIK et al., 2002; DIAS et al., 2008). Outros fatores, como espaço das instalações e densidade do rebanho, também devem ser considerados (VONK NOORDEGRAAF et al., 2004).

Como já citado anteriormente, a infecção latente tem extrema importância epidemiológica por manter o BoHV-1 no rebanho por longos períodos.

2.9.1. Situação no mundo

Na Europa, a taxa de rebanhos positivos varia consideravelmente, de 20 a 90% (VAN OIRSCHOT et al., 1996; CASTRUCCI et al., 1997; RUSVAI; FODOR, 1998; BIUK-

RUDAN et al., 1999; BOELAERT et al., 2000; ACKERMANN; ENGELS, 2006; STILWELL et al., 2007). Entretanto, alguns países da comunidade europeia, como Suíça, Áustria, Dinamarca, Noruega, Suécia e Finlândia, têm baixas taxas de animais soropositivos graças a programas sorológicos seguidos de eliminação de portadores (ACKERMANN et al., 1990; STRAUB, 1991; VAN OIRSCHOT et al., 1996). Enquanto isso, outros países como a Alemanha e a Bélgica, optaram pelo controle das infecções pelo BoHV-1 através da utilização de estratégias de diferenciação entre animais vacinados e infectados. No caso, usam-se vacinas com deleção da gE, que não interferem no teste sorológico para detecção dos animais naturalmente infectados (MUYLKENS et al., 2007).

A infecção também tem sido bastante pesquisada na África e Ásia, com índices que podem ser comparados aos de outros continentes (KAMPA et al., 2004; ALKAN et al., 2005; DEKA RAMNEEK et al., 2005; YAN et al., 2008). Na Índia, entre os anos de 1986 e 2006, de 7313 amostras testadas por ELISA de captura ou vírus-neutralização, 3152 foram positivas, correspondendo a 41% dos animais testados (ANON, 2007 apud NANDI et al., 2009).

Na Oceania o agente tem sido detectado e, após tipificação, o BoHV-1.2b foi determinado como o subtipo predominante tanto na Austrália quanto na Nova Zelândia (WANG et al., 2006; ANIMAL HEALTH AUSTRALIA, 2008 apud CAMPOS, 2009).

Nos Estados Unidos e Canadá, onde a infecção tem caráter endêmico, não existem políticas nacionais de erradicação. Estes países optaram pelo controle através de programas imunoprolifáticos utilizando vacinas com vírus atenuado e/ou inativado (ALFIERI et al., 1998; CARDENAS et al., 2006).

Com relação à América do Sul, levantamentos epidemiológicos e identificação de surtos realizados na Argentina, Uruguai e Colômbia demonstraram o caráter endêmico das infecções pelo BoHV-1, com frequência de animais sororreagentes variando de 8,8 a 84,1% (ODEON et al., 2001 apud CAMPOS, 2009; GUARINO et al., 2008).

2.9.2. Situação no Brasil

Evidências sorológicas e etiológicas demonstram a presença e alta frequência, das infecções pelo BoHV-1 nos rebanhos brasileiros. A porcentagem de animais sororreagentes varia consideravelmente entre os levantamentos epidemiológicos, porém, na maioria dos trabalhos, os índices de animais soropositivos são superiores ou estão muito próximos a 50% das amostras analisadas (Tabela 4).

Tabela 4: Percentagem de animais soropositivos para BoHV-1 em rebanhos bovinos no Brasil, assinalada por diferentes autores.

Referência	Estado	Total	Técnica	Positivos (%)
Galvão et al. (1962)	BA	458	SN	34,5
Wizigmann et al. (1972)	RS	229	SN	33,0
Mueller et al. (1981)	SP	384	SN	42,2
Ribeiro et al. (1982)	BA	2057	SN	74,0
Nogueira et al. (1986)	RJ	21	SN	77,8
Ribeiro et al. (1987)	BA	1618	SN	10,8
Pituco (1988)	MG, PR, SP, RS	1681	SN	22,1
Ravazzolo et al. (1989)	RS	526	SN	81,8
Langoni et al. (1995)	SP	184	ELISA	49,5
Lovato et al. (1995)	RS	7956	SN	18,8
Silva et al. (1995)	PE	282	SN	69,5
Vidor et al. (1995)	RS	2341	SN	31,9
Médici et al. (1996)	PR	150	ELISA	54,0
Tonin et al. (1996)	SP	532	ELISA	40,2
Barros Filho et al. (1997)	PR	240	SN	27,1
Krahl et al. (1997)	RS	1823	SN	29,3
Melo et al. (1997)	SE	102	SN	96,0
Melo et al. (1999)	PB	142	SN	62,7
Richtzenhain et al. (1999)	21 estados	21062	ELISA	64,3
Cerqueira et al. (2000)	BA	558	ELISA	56,0
Cerqueira et al. (2000)	BA	558	SN	48,0
Grégio et al. (2000)	RJ	235	SN	56,0
Médici et al. (2000)	PR	7397	SN	50,8
Dias et al. (2008)	PR	291	ELISA	61,5 a 88
Holz et al. (2009)	RS	2200	SN	57,7
Souza et al. (2009)	MA	156	ELISA	67,5

2.9.3. Ocorrência de abortamentos por BoHV-1 frente a outras causas infecciosas e não infecciosas

Devido a inúmeras dificuldades na identificação do agente causal de casos de abortamentos e às possíveis múltiplas causas envolvidas, somente 30,2 a 45,5% dos fetos bovinos abortados apresentam diagnóstico etiológico definitivo. Destas, geralmente 30 a 34,4% são causas infecciosas, sendo 4,2 a 10,57% virais e 1,68 a 5,41% causadas pelo BoHV-1 (KIRKBRIDE et al., 1985; KIRKBRIDE, 1992; CAMPERO et al., 2003). A Tabela 5 apresenta as possíveis causas infecciosas de abortamentos em bovinos.

No Brasil, Corbellini et al. (2006), em estudo realizado no sul do país, identificaram a causa do abortamento em 51,5% dos casos, destas sendo 1,8% de causa viral (BVDV, neste caso), porém, não foi encontrado abortos causados por BoHV-1 neste estudo. Já Cortez et al. (2006) analisaram 114 fetos bovinos abortados e 10 bezerros com mortalidade perinatal por PCR e encontraram 22,6% de causas infecciosas, sendo 5,6% de causas virais e 3,2% por BoHV-1. Cabe ressaltar que os estudos investigativos quanto à pesquisa de agentes infecciosos em abortamentos bovinos ainda são escassos no país.

Tabela 5: Causas infecciosas de abortamentos em bovinos.

Vírus	Bactéria	Fungo	Protozoário
BoHV-1	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neospora caninum</i>
BoHV-4	<i>Histophilus somni</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Trichomonas foetus</i>
BVDV	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>Mortierella wolfii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
BTV	<i>Brucella abortus</i>		<i>Anaplasma marginale</i>
AKV	<i>Leptospira spp.</i>		
	<i>Listeria monocytogenes</i>		
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>		
	<i>Chlamydophila abortus</i>		
	<i>Salmonella sp.</i>		
	<i>Coxiella burnetti</i>		
	<i>Mycoplasma spp.</i>		
	Aborto enzoótico		

Legenda: AKV: vírus Akabane; BoHV-1: herpesvírus bovino tipo 1; BoHV-4: herpesvírus bovino tipo 4; BVDV: vírus da diarreia viral bovina; BTV: vírus da língua azul.

2.10. Diagnóstico

2.10.1. Diagnóstico clínico

Em casos de aborto, mesmo em primo-infecções com focos de abortamentos após doença respiratória, o diagnóstico clínico não é conclusivo. Para isso, deve ser feita a diferenciação de outras causas infecciosas (Tabela 5) e de causas não infecciosas, como as relacionadas ao manejo (estresse térmico), endotoxinas, corticosteróides exógenos, desordens genéticas ou nutricionais, teratogenia, plantas tóxicas, micotoxinas, entre outras causas, também devem ser incluídas no diagnóstico diferencial (LARSON, 1996).

O diagnóstico clínico das infecções causadas pelo BoHV-1 é apenas presuntivo nos casos de IPV e IPB, onde as lesões são bastante características. Porém, mesmo nestas situações, devem ser descartados outros quadros clínicos com infecções por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum*, que são responsáveis por vaginite granular (RUHNKE et al., 1984). Para todas as outras formas de apresentação, o diagnóstico clínico é praticamente impossível. Nos quadros clínicos que envolvem o sistema respiratório, é importante diferenciar a infecção pelo BoHV-1 daquelas ocasionadas por outros patógenos que estão agrupados no Complexo Respiratório Bovino, como o BRSV, BVDV, PI-3 e bactérias do gênero *Pasteurella* (OBANDO et al., 1999).

Portanto, a realização de um diagnóstico conclusivo das infecções causadas pelo BoHV-1, independente da sua forma de apresentação, depende do apoio de uma estrutura laboratorial.

2.10.2. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de BoHV-1 pode ser etiológico (viroológico ou molecular) ou sorológico. A identificação da partícula viral, antígenos ou genoma vírico pode ser obtida a partir de fragmentos de órgãos de fetos abortados, como o fígado, rim, pulmão, baço, linfonodos, timo e cotilédone fetal (ALFIERI et al., 1998), o que torna possível o uso de uma grande variedade de testes.

2.10.2.1. Diagnóstico virológico

O diagnóstico virológico das infecções por BoHV-1 é realizado através da identificação de antígenos virais sobre secreções ou tecidos de animais infectados (imunofluorescência direta, imuno-histoquímica), do isolamento do vírus em cultivos celulares ou, ainda, através de métodos moleculares (ROEHE et al., 1997). Porém, para

realização destes testes, é necessário que a amostra clínica contenha número suficiente de partículas virais.

O isolamento do BoHV-1 em cultivo celular é considerado a prova ouro (*golden standard*) em diagnóstico virológico, sendo utilizada como padrão de comparação com qualquer outro método. Entretanto, é uma técnica laboriosa, de custo elevado e dispendiosa em relação ao tempo dedicado para a sua elaboração. Esta metodologia apresenta ainda como desvantagem a necessidade de material clínico bem conservado, já que a técnica exige a presença de partículas virais viáveis, ou seja, infectantes. Nos abortos comprovadamente ocasionados pelo BoHV-1, geralmente de 30 a 40% dos casos é possível o isolamento viral (SMITH et al., 1989; KIRKBRIDE, 1992). Isto ocorre principalmente devido às oscilações de temperatura, as quais o vírus é lábil, e ao alto grau de autólise, inviabilizando o isolamento pela perda da infecciosidade da partícula viral (KIRKBRIDE, 1992). Além disso, esse tipo de material pode apresentar alto grau de citotoxicidade, dificultando o sucesso no isolamento e em outras técnicas que necessitem do cultivo celular, como a imunoperoxidase (IPX) e a imunofluorescência direta (IFD) (HYNDMAN et al., 1998). O tempo exigido para a obtenção de resultados é outra desvantagem da técnica pois são necessários, no mínimo, de 14 a 28 dias para a conclusão do diagnóstico (TAKIUCHI et al., 2001).

Para a execução do isolamento viral em cultivo celular, suspensões de tecidos ou secreções são inoculadas em sobre cultivos de células, as quais podem ser originárias de cultivos primários ou linhagens celulares contínuas (Tabela 6). Após um período variável de incubação, a presença de vírus é detectada pelo efeito citopático (CP) causado nos cultivos celulares, que são desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular; formação de focos infecciosos com o aspecto de “cachos de uva”, lise e corpúsculos de inclusão intranucleares (WEIBLEN et al., 1992; ROEHE et al., 1997; BRUM; WEIBLEN, 2007).

Laboratórios que manipulam BoHV-1 e BVDV têm preferido o uso de células CRIB em relação a outras células para o isolamento em cultivo celular, pelo fato de estas serem resistentes a infecções pelo BVDV, que possui amostras CP e também não CP, podendo ocorrer infecções sem o efeito CP característico do vírus.

O diagnóstico rápido buscando a identificação de células contendo antígenos virais em secreções ou tecidos pode ser obtido através das provas de IFD ou IPX. Estes testes dependem essencialmente do tipo de anticorpos empregados para a detecção do antígeno (ROEHE et al., 1997).

Tabela 6: Células susceptíveis para replicação *in vitro* de BoHV-1. Adaptado de Brum e Weiblen (2007).

Cultivos primários	Células de linhagem
Pulmão de bovino	CRIB
Corneto nasal de bovino	MDBK
Rim de bovino	BT
Testículo de bovino	HeLA
	EBTr

2.10.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR tem como objetivo a amplificação de uma região específica do DNA viral. Apresenta como vantagens o potencial de altos índices de sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução. Além disso, permite a análise de uma grande variedade de amostras biológicas, fragmentos de tecidos de feto abortado, sistema nervoso central, secreções, sêmen e cultura de tecidos, contendo partículas virais viáveis e não viáveis.

Com frequência são realizadas amplificações de regiões conservadas dos genes que codificam a gB (VILCEK et al., 1994; MASRI et al., 1996; MWEENE et al., 1996; SANTURDE et al., 1996; KATARIA et al., 1997; ROCHA et al., 1998a), gC (VAN ENGELBURG et al., 1993; KATARIA et al., 1997; ESTEVES et al., 2008), gD (WEIDMANN et al., 1993; GEE et al., 1996; WAGTER et al., 1996; ZHOU et al., 1999), gE (FUCHS et al., 1999; SCHYNTS et al., 1999) e a timidina quinase (KIBENGE et al., 1994; YASON et al., 1995; MOORE et al., 2000).

Pesquisas recentes vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de estabelecer uma PCR sensível e rápida para detecção de BoHV-1 em abortamentos, para uso na rotina laboratorial. Já foram descritas detecções por PCR em fetos abortados por BoHV-1 de animais experimentalmente e naturalmente infectados (MILLER et al., 1995; POSPSIL et al., 1996, ROCHA et al., 1998b; TAKIUCHI et al., 2003; TAKIUCHI et al., 2005; CORTEZ et al., 2006). Nesses estudos, os autores sempre ressaltam a maior sensibilidade da PCR, quando comparada aos métodos mais tradicionais. Além disso, Masri et al. (1996) relataram que a técnica de PCR também poder ser capaz de detectar o BoHV-1 precocemente, a partir do quarto dia pós-infecção, antes mesmo do aparecimento de anticorpos detectáveis pelos procedimentos sorológicos tradicionais.

2.10.2.3. Análise por enzimas de restrição

Este tipo de análise é voltado para a caracterização genômica de amostras já isoladas, sendo, desta forma, dependente de isolamento ou multiplicação do vírus em cultivo celular, para posterior extração e clivagem do DNA viral com enzimas de restrição. Uma vez realizadas as digestões enzimáticas, os produtos obtidos são analisados em gel de agarose a fim de determinar o perfil de restrição do DNA clivado (ENGELS et al., 1981; BRAKE; STUDDERT, 1985; ENGELS et al., 1986; METZLER et al., 1986; BULACH; STUDDERT, 1990; EDWARDS et al., 1990; D'OFFAY et al., 1993; PIDONE et al., 1999). Este método é bastante usado para determinação dos subtipos virais 1.1, 1.2a e 1.2b de BoHV.

2.10.2.4. Diagnóstico sorológico

As técnicas de sorologia usadas mais frequentemente são a soroneutralização (SN) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Elas são importantes por demonstrarem que os animais positivos já foram expostos ao vírus e apresentam soroconversão. A identificação de problemas clínicos causados pelo BoHV-1, através de provas sorológicas, só pode ser realizada por sorologia pareada onde evidencia-se um aumento no título de anticorpos presentes em amostras de soro do mesmo animal, colhidas com intervalo de três a quatro semanas. Desta forma, a sorologia pareada é útil somente nos casos de infecções recentes, onde os títulos de anticorpos são crescentes (WYLER et al., 1989).

As técnicas sorológicas são incapazes de diferenciar animais vacinados de animais expostos ao vírus de campo. Esses animais, assim como os animais com a infecção na forma latente, apresentarão uma flutuação no título de anticorpos, com tendência a queda ao longo do tempo, sendo necessária a adoção de outras técnicas na busca pelo diagnóstico correto (ALFIERI et al., 1998).

2.10.2.4.1. Soroneutralização

A SN é considerada a técnica padrão para detecção de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1. Entretanto, é uma técnica onerosa que depende da manutenção de estoque de vírus e de cultivos celulares adequados. O período de incubação para neutralização do vírus através dos anticorpos pode variar de 1 a 24 horas e o resultado da prova é geralmente obtido em três a cinco dias (PERRIN et al., 1993; KRAMPS et al., 1996; KRAMPS et al., 2004).

O uso de diferentes cepas pode alterar a sensibilidade da técnica de SN. Geralmente, a técnica é realizada com o uso de uma amostra de referência, entretanto, o uso de várias amostras melhora a sensibilidade do teste (HOLZ et al., 2009; VARELA et al., 2010).

A SN não permite uma diferenciação clara entre animais infectados por BoHV-1 ou BoHV-5. Cerca de 92% dos animais infectados com ambos os vírus apresentam reações cruzadas quando a prova é realizada frente a ambos, ressaltando o alto grau de reatividade cruzada existente entre estes dois vírus (ROEHE et al., 1998; TEIXEIRA et al., 1998).

2.10.2.4.2. ELISA

Provas de ELISA têm sido muito utilizadas para diagnóstico sorológico devido a sua alta sensibilidade, especificidade, capacidade de processamento de grande número de amostras, relativa facilidade e rapidez de execução. Os reagentes são, em princípio, baratos, estáveis, fáceis de preparar e, geralmente, os resultados de ELISA, podem ser quantificados através do uso de um simples espectrofotômetro (BOLTON et al., 1983), podendo ser utilizada para amostras de soro sanguíneo e leite (VAN WUIJCKHUISE, 1998; STAHL et al., 2002; KAMPA et al., 2004).

Na Europa, em função do uso de vacinas com vírus com deleção da gE, têm sido utilizados testes de ELISA para detecção de soroconversão da gE, o que tem possibilitado a diferenciação entre animais infectados e vacinados (MARS et al., 2000; MUYLKENS et al., 2007).

No Brasil, o uso de testes de ELISA comerciais tem sido dificultado em função do custo de aquisição dos mesmos, em função disso, alguns laboratórios, utilizam seus próprios testes de ELISA produzidos internamente para determinados agentes (TEIXEIRA et al., 2001; SPILKI et al., 2005).

Atualmente, no comércio mundial, há vários tipos de ELISA disponíveis para diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1 (HERRING et al., 1980; CHO; BOHAC, 1985; EDWARDS; GITAO, 1987; KRAMPS et al., 1994; GRAHAM et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2001; WELLENBERG et al., 2001; KRAMPS et al., 2004).

Assim como na SN, pode ocorrer reação cruzada em animais expostos ao BoHV-1 ou BoHV-5 (TEIXEIRA et al., 2001; WELLENBERG et al., 2001).

2.11. Prevenção e controle

As medidas de controle em relação ao BoHV-1 devem ser relacionadas com a severidade da infecção no rebanho, práticas de manejo e com a prevalência da infecção. Para isso, é importante o conhecimento da situação sorológica do rebanho, independente da apresentação ou não de sinais clínicos.

Em rebanhos soronegativos, deve-se evitar a introdução da infecção. Isso é facilmente realizado em rebanhos fechados, onde a reposição é criada na própria propriedade. Já em rebanhos com introdução de animais, devem realizar exames sorológicos pareados para a verificação do estado sanitário do animal (STRAUB, 1990; GEE et al., 1996). Outros riscos potenciais de introdução de BoHV-1 num rebanho são a inseminação artificial e a transferência de embriões (GUERIN et al., 1989; STRAUB, 1990). Para isso as centrais de coleta de sêmen devem manter, preferencialmente, animais sorologicamente negativos. Já animais geneticamente superiores, mas soropositivos, devem ser manejados em separado e ter seus ejaculados testados para assegurar a ausência do vírus (ROCHA et al., 1999). Na transferência de embriões, deve-se realizar o tratamento dos embriões com tripsina e cuidados na armazenagem, evitando o uso de *container* abertos (SINGH et al., 1983, BIELANSKI; LALONDE, 2009).

Rebanhos com histórico comprovado de infecção, com sorologia elevada, sistemas de recria e confinamento que agregam novilhos de várias procedências, além de propriedades com alta rotatividade de animais (compra, venda, transporte, etc.) são recomendados a implementar a vacinação. Nessas situações, a vacinação contínua e regular pode reduzir a circulação de vírus e a ocorrência de doença clínica, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas (FRANCO; ROEHE, 2007).

2.11.1. Vacinas

O uso de vacinas tem como objetivo controlar a disseminação do vírus e reduzir a severidade da doença clínica e as conseqüentes perdas associadas ao BoHV-1. Porém, as vacinas atuais ainda são incapazes de proteger contra o estabelecimento de latência com vírus de campo, ou seja, os animais vacinados podem se tornar latentemente infectados se forem posteriormente infectados (GALEOTA et al., 1997). Além disso, as vacinas disponíveis no Brasil ainda impossibilitam a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados pelos métodos sorológicos tradicionais (TURIN et al., 1999).

2.11.1.1. Vacinas inativadas

Vacinas inativadas apresentam o agente inativado por compostos químicos específicos ou métodos físicos (HALFEN, 1996 apud SPILKI, 2004; PETZHOLD et al., 2001). As mesmas são consideradas, em geral, menos efetivas do que as vacinas vivas; todavia, é consenso que são mais seguras devido a não ocorrer replicação do vírus vacinal no hospedeiro (FRERICHS et al., 1982).

2.11.1.2. Vacinas vivas convencionais

Vacinas vivas atenuadas são comercializadas praticamente desde o primeiro isolamento do BoHV-1. A atenuação é obtida, usualmente, por passagens sucessivas em cultivos celulares ou pela indução de mutações. Para o desenvolvimento deste tipo de vacina, diferentes amostras têm sido testadas desde padrões do vírus naturalmente atenuadas até mutantes termo-sensíveis (ZYGRAICH et al., 1974), todas elas disponíveis no mercado. Tais vacinas são eficazes na prevenção de sinais clínicos associados à infecção. Algumas desvantagens pós-vacinação são comumente relatadas como a indução de abortos em vacas prenhes (LOMBA et al., 1976), excreção do vírus vacinal e reversão à virulência (BRYAN et al., 1994), além da dificuldade em caracterizar-se adequadamente as deleções/inserções genômicas associadas aos métodos de atenuação convencional (JONES et al., 2000; THIRY et al., 1985). Essas vacinas estão disponíveis para utilização, tanto pela via intramuscular, quanto pela intranasal.

2.11.1.3. Vacinas de subunidade e vacinas de DNA

Uma das alternativas para contornar o problema da impossibilidade de discriminação da resposta induzida pela infecção ou vacinação com vacinas convencionais é a imunização utilizando proteínas selecionadas do genoma viral (vacinas de subunidade) que induzam resposta imune protetora e, mais recentemente, a vacinação com o próprio DNA que codifica os genes de tais proteínas (vacinas de DNA) (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1990; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1997). Entretanto, essas vacinas ainda apresentam menor eficiência quando comparadas a vacinas inativadas e vacinas vivas (BOSCH et al., 1997; BOSCH et al., 1998; KÖNIG et al., 2003).

2.11.1.4. Vacinas diferenciais

Avanços recentes no entendimento das funções de diferentes glicoproteínas (Tabela 3) e enzimas do BHV-1 têm permitido o desenho de uma nova geração de imunógenos para o combate da infecção (TURIN et al., 1999). Assim, a deleção de genes estruturais não essenciais, como a gE e a timidina-quinase viral, por exemplo, têm proporcionado a confecção de novos vírus vacinais que, além de mais seguros, ainda permitem, com o auxílio de testes diagnósticos adequados, a identificação dos animais infectados com amostras de campo em meio aos animais vacinados, o que confere a estas vacinas a denominação de vacinas diferenciais (VAN OIRSCHOT, 1999). Assim, são alvos potenciais de tal estratégia quaisquer proteínas que, quando ausentes do vírion, reduzam a virulência do vírus vacinal em

relação à amostra parental e que por outro lado, sejam alvo dos anticorpos do hospedeiro após infecções naturais. Deste modo, animais que tenham anticorpos contra a proteína ausente no vírus vacinal são considerados infectados e estratégias de controle adequadas podem ser tomadas, mesmo utilizando-se a vacinação para reduzir a excreção viral e conseqüente disseminação do BoHV-1 no rebanho (SPILKI, 2004).

3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE BoHV-1 EM DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS E SEU USO EM PROPRIEDADES COM BAIXAS TAXAS REPRODUTIVAS

Os dados que seguem na parte experimental desta monografia foram obtidos durante o período de graduação com bolsa de Iniciação Científica e executados pelo graduando no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esses experimentos tiveram como objetivo estabelecer um protocolo para diagnóstico diferencial das infecções causadas pelo BVDV, que é uma das principais linhas de pesquisa do laboratório, e teve uma doutoranda e uma mestranda trabalhando no assunto durante o período: Laura Lopes de Almeida e Ângela Oliveira Corbellini, respectivamente.

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Amostras

Para a padronização da técnica, foram utilizadas amostras negativas de sangue total, soro sanguíneo, sobrenadante de cultivo celular, sêmen, leite, líquido folicular, líquidos fetais e suabes nasal e genital de bovinos. As amostras de soro foram obtidas após centrifugação do sangue total a 2000 x g durante 10 minutos, enquanto as amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo EDTA. O sobrenadante de cultivo celular foi proveniente de células MDBK cultivadas com DMEM, congeladas e submetidas à centrifugação a 2000 x g durante 10 minutos. Foi usado sêmen diluído com gema de ovo, para uso em inseminação artificial, este foi centrifugado 1500 x g para obtenção do líquido seminal. O leite foi centrifugado para obtenção das células somáticas e lavado com PBS, segundo Drew et al. (1999). Já as amostras de suabe, foram coletadas com o auxílio de suabe estéril e armazenadas em tubos contendo 500 µL de PBS pH 7,2 e, posteriormente, centrifugadas a 2000 x g durante 10 minutos. Essas amostras foram contaminadas artificialmente com BoHV-1, amostra Los Angeles, de título $10^{7,58}$ TCID₅₀/mL, com diluições seriadas na base 10, de 10^{-1} a 10^{-7} .

Posteriormente, foram obtidas amostras de soro sanguíneo (69), suabe nasal (16) e suabe genital (4) de 81 animais de rebanhos gaúchos com histórico de problemas reprodutivos.

3.1.2. Extração de DNA e PCR

A extração de DNA foi realizada em 100 µL de amostra, utilizando um protocolo a base de partículas de sílica (BOOM et al. 1990).

Para a PCR, foram selecionados os *primers* gE-1 e gE-2, que amplificam um fragmento de 265 pb de uma região da gE do BoHV-1 (acesso no GenBank: U06934) (Tabela 7) (FUCHS et al., 1999). Como as condições da reação estavam adequadas para uma reação multiplex, esta foi padronizada para uma reação simples. A PCR foi otimizada em um volume total de 25 µL, contendo 0,2 mM de dNTP mix, 2 mM de MgCl₂, 1 x tampão de PCR (10 mM Tris HCl pH 8,5 e 50 mM KCl), 40 pmol de cada *primer*, 5% de DMSO e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase. As amostras foram pré-desnaturadas a 96°C durante 10 minutos e sofreram 35 ciclos de 96°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C durante 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão) finalizando com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados sob luz ultravioleta (UV), comparados com marcador de peso molecular de escala de 100 pb.

Tabela 7: Seqüências dos oligonucleotídeos e sua localização correspondente na gE de BoHV-1.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Localização do <i>primer</i>
gE-1	5' – GCTTCGGTCGACACGGTCTT - 3'	501–520
gE-2	5' – CTTTGTCGCCCGTTGAGTCG - 3'	746–765

3.2. Resultados

3.2.1. Padronização da PCR para detecção de BoHV-1 em diferentes amostras biológicas

O sangue total, soro sanguíneo, sobrenadante de cultivo celular, sêmen, leite, líquido folicular, fluidos fetais e suabes tiveram um limite mínimo de detecção de 10^{2,2}, 10^{1,2}, 10^{1,2}, 10^{2,2}, 10^{1,2}, 10^{1,2}, 10^{4,2} e 10^{2,2}, respectivamente. A Figura 5 ilustra os fragmentos amplicados por PCR das amostras de sobrenadante de cultivo celular visualizados em gel de agarose sob luz UV.

3.2.2. Detecção de BoHV-1 em animais naturalmente infectados

Foram amplificados os fragmentos de DNA esperados de BoHV-1 em 9 dos 81 animais testados, correspondendo a 11,11% de positividade. Das amostras de soro sanguíneo, 4 apresentaram-se positivas, enquanto 4 suabes nasais e 1 suabe vulvar também foram positivos. Nenhum dos animais com mais de um tipo de amostra coletada apresentaram positividade em ambas.

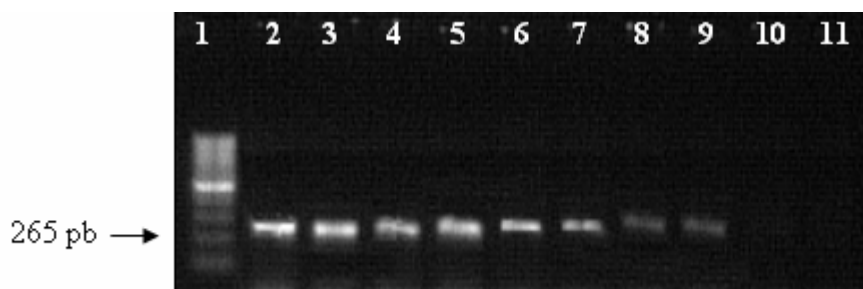


Figura 5: Produtos de amplificação do sobrenadante de cultivo celular submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Linha 1: marcador de peso molecular de escala de 100 pb; Linhas 2 e 3: amostra diluída 1:10; Linhas 4 e 5: amostra diluída 1:100; Linhas 6 e 7: amostra diluída 1:1000; Linhas 8 e 9: amostra diluída 1:10000; Linhas 10 e 11: amostra diluída 1: 100000.

3.3. Discussão

As variações nos limites de detecção por PCR nas diferentes classes de amostras biológicas obtidas nesse estudo ocorreram provavelmente devido à presença de inibidores, que podem variar conforme o tipo de amostra e interferir na sensibilidade da técnica. Os inibidores de PCR geralmente exercem seus efeitos diretamente sobre o DNA ou sobre a polimerase termorresistente. Além disso, podem atuar quelando os íons magnésio, afetando indiretamente a *Taq* DNA polimerase, pois são importantes cofatores (WIEDBRAUK et al., 1995; HALE et al., 1996; AL-SOUD & RADSTROM, 1998; HYNDMAN et al., 1998). Procedimentos eficientes de remoção ou inativação destes agentes são necessários para o sucesso na amplificação do DNA viral (HALE et al., 1996).

A identificação de 11,11% de animais positivos para BoHV-1 por PCR foi maior que o esperado em uma amostragem aleatória e isso pode ser explicado devido a presente amostragem ter sido direcionada a animais com suspeita clínica. Apesar das altas prevalências de soropositividade dos rebanhos gaúchos frente esse agente (18,8 a 81,8%) (PITUCO, 1998; REVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995; KRAHL et al., 1997;

HOLZ et al., 2008), estes valores se referem a animais que já tiveram contato com o vírus e podem estar com infecção latente. A técnica da PCR para detecção de BoHV-1 baseia-se na amplificação de um fragmento específico do DNA viral, que será visualizado nas amostras de animais que estiverem com infecção ativa, não latente, considerando-se as amostras usadas nesse experimento.

A utilização de amostras de suabe diretamente de lesões sugestivas de infecção pelo BoHV-1 é uma boa opção para o sucesso na detecção do vírus, visto que o vírus faz replicação local e geralmente está presente em títulos que podem atingir até 10^{10} TCID₅₀/mL, durante a primo-infecção (NANDI et al., 2009).

Para a detecção de BoHV-1 no sangue, é necessário que o animal esteja em viremia, já que, geralmente, o vírus circula associado a células (NYAGA; McKERCHER, 1979; ENGELS; ACKERMANN, 1996), sendo portanto, pouco convencional o uso de amostras de soro sanguíneo para sua detecção. Porém, Kaashoek et al. (1996) demonstrou que pode ocorrer circulação do vírus não associado a células, sendo detectado no soro de animais experimentalmente infectados em amostras de alta virulência. O BoHV-4, outro herpesvírus de bovinos, porém da subfamília *Gammaherpesvirinae*, também já foi detectado circulando livre no soro de animais naturalmente e experimentalmente infectados (EGYED et al., 1999).

No presente estudo, optou-se em utilizar amostras de soro devido a sua disponibilidade e conveniência, pois elas eram coletadas originalmente para o projeto de pesquisa de BVDV, como já citado anteriormente, a principal linha de pesquisa de nosso laboratório. Estes resultados reforçaram a possibilidade de circulação do BoHV-1 não associado a células e parecem ser a primeira evidência descrita de detecção de BoHV-1 no soro de animais naturalmente infectados.

4. CONCLUSÃO

O BoHV-1 deve ser sempre incluído na busca pelo agente etiológico por ser uma importante causa de abortamentos de bovinos, além de sua conhecida importância como patógeno desta espécie e visto a sua alta frequência nos plantéis mundiais e brasileiros. Ainda, deve-se sempre considerar a possível presença da infecção latente dentro do rebanho, que quando reativada, pode acometer animais prenhes e gerar grandes prejuízos. Portanto, o conhecimento do estado sanitário do rebanho é de extrema importância na identificação do BoHV-1, aliada ao controle da entrada de animais, sêmen e material para transferência de embriões.

Na parte experimental desta monografia, foi estabelecido um protocolo de PCR para detectar o BoHV em diferentes tipos de amostras biológicas. Desta forma, foi possível realizar a primeira detecção descrita de BoHV-1 no soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados, o que reforça a possibilidade de vírus livre circulante, conforme já proposto por Kaashoek et al. (1996). Os mecanismos responsáveis pela ocorrência ou não da viremia e como esta pode ocorrer ainda devem ser investigados, visto que ainda existe pouco conhecimento sobre este assunto, embora seja um agente de grande importância na ocorrência do abortamento.

REFERÊNCIAS

ABINANTI, F. R.; PLUMER, G. J. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from cattle affected with conjunctivitis-observations on the experimental infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.22, p.13-17, 1961.

ACKERMANN, M.; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Veterinary Microbiology**, v.9, p.53-63, 1984.

ACKERMANN, M.; WEBER, H.; WYLER, R. Aspects of infectious bovine rhinotracheitis eradication programmes in a fattening cattle farm. **Preventive Veterinary Medicine**, v.9, p.121-130, 1990.

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

AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, v.60, n.2, p.93-109, 1990.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C. Consequências da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.19, n.1, p.86-93, 1998.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.38, n.4, p.919-920, 1978.

ALKAN, F.; BURGU, I.; BILGE-DAGALP, S.; YILDIRIM, Y.; GENÇAY, A.; GÜNGÖR, A.B.; ATASEVEN, V.S.; AKÇA, Y. The seroprevalence of BHV-1 infection on selected dairy cattle herds in Turkey. **Revue de Médecine Veterinaire**, v.156, n.3, p.166-169, 2005.

AL-SOUD, W.A.; RADSTROM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and Environment Microbiology**, v.64, p.3748-3753, 1998.

ARMSTRONG, J.A.; PEREIRA, H.G.; ANDREWES, C.H. Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis and its affinity with the herpesvirus group. **Virology**, v.14, p.276-285, 1961.

ASHBAUGH, K.; THOMPSON, K.; BELKNAP, E.; SCHULTHEISS, P.; CHOWDURY, S.; COLLINS, J. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, n.4, p.387-394, 1997.

BABIUK, L.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HUCRK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.31-42, 1996.

BARENFUS, M.; DELLIQUADRI, C.A.; MCINTYRE, R. W.; SCHROEDER, R. J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.143, p.725-728, 1963.

BARROS FILHO, I.R.; KRÜGER, E.R.; SOUZA, J.F.; RICKLI Jr., W. Incidência de bovinos soropositivos para o vírus da rinotraqueíte no Município de Palotina – PR. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997, Gramado, Brasil, p.171.

BAUGUST, T.J.; CLARK,L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.82, n.1, p.375-383, 1972.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v.31, n.3, p.358-365, 1994.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization of bovine oocytes exposed to bovine herpesvirus 1 (BHV-1). **Reproduction in Domestic Animals**, v.28, p.285-288, 1993.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, p.1211–1217, 1994.

BIELANSKI, A.; LUTZE-WALLACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.1–8, 1997.

BIELANSKI, A.; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.40, p.110–116, 2000.

BIELANSKI, A.; LALONDE, A. Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1. **Theriogenology**, v.72, p.919–925, 2009.

BIUK-RUDAN, N.; CVELNIC, S.; MADIC, J.; RUDEN, D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, v.51, p.875–881, 1999.

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, n.3-4, p.285-295, 2000.

BOELAERT, F.; SPEYBROECK, N.; DE KRUIF, A.; BERKVEN, D.L.; AERTS, M.; BURZYKOWSKI, T.; MOLENBERGHS, G. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Preventive Veterinary Medicine**, v.69, p.285-295, 2005.

BOLTON C.D. Evaluation of the critical parameters of a sensitive ELISA test using purified infectious bovine rhinotracheitis virus antigens. **Veterinary Microbiology**, v.6, p.265-279, 1981.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M; JANSSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. Rapid and simple method for purification nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

BOSCH J.C.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT J.T. Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. **Vaccine**, v.15, p.1512-1517, 1997.

BOSCH, J.C.; DE JONG, M.C.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; HAGE, J.J.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; NOORDHUIZEN, J.P.; VAN DER POEL, W.H.; VERHOEFF, J.; WEERDMEEESTER, K.; ZIMMER, G.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. **Vaccine**, v.16, p.265-271, 1998.

BRAKE, F.; STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v.62, n.10, p.331-334, 1985.

BROWER, A.; HOMB, K.M.; BOCHSLER, P.; PORTER, R.; WOODS, K.; UBL, S.; KRUEGER, D.; CIGEL, F.; TOOHEY-KURTH, K. Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with bovine herpesvirus 1 infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, United States**, v.20, p.297-303, 2008.

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, 2007, cap.3, p.59-86.

BRYAN, L.A.; FENTON, R.A.; MISRA, V.; HAINES, D.M. Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p.223-228, 1994.

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

BUONAVOGLIA, C.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; VOIGT, V.; BUONAVOGLIA, D.; CONSERVA, A.; CORRENTE, M. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.19, p.275-281, 1996.

CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; ODEÓN, A.C.; CIPOLLA, A.L.; ODRIOZOLA, E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. **Veterinary Research Communications**, v.27, p.359-369, 2003.

CAMPOS, M.; ROSSI, C.R. Cytotoxicity of bovine herpesvirus lymphocytes after treatment with lymphokines. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.1524-1528, 1986.

CAMPOS, M.; OHMANN, H.B.; HUTCHINGS, D.; RAPIN, N.; BABIUK, L.A.; LAWMAN, M.J.; Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells. **Cellular Immunology**, v.120, p.259-269, 1989

CAMPOS, F.S. **Detecção de infecções latentes por herpesvírus bovino 1 e 5 em gânglios trigêmeos de bovinos através da técnica de reação em cadeia da polimerase**. 2009. 120 p. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CÁRDENAS, A.B.; ARANGO, C.J.J.; MAYA, J.J.M.; HIROSE, J.A.M.; BERNAL, A.O. Comparison between three diagnostic tests to detect abortion caused by infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds. **Veterinaria Mexico**, v.37, n.2, p.151-163, 2006.

CASTRUCCI, G.; MARTIN, W. B.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; SALVATORI, D.; TAGLIATI, S.; CUTERI, V. A serological survey of bovine herpesvirus-1 infection in selected dairy herds in northern and central Italy. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, England, v.20, n.4, p.315-317, 1997.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; SALVATORI, D.; FERRARI, M.; SARDONINI, Q.; CASSAI, E.; LO, D.M.; ROTOLA, A.; ANGELINI, R. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, p.29-41, 2002.

CERQUEIRA, R.B.; CARMINATI, R.; SILVA, J.M.; SOARES, G.C.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.6, p.497-500, 2000.

CHO, H.J.; BOHAC, J.G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.49, n.2, p.189-194, 1985.

CIACCI-ZANELLA, J.; STONE, M.; HENDERSON, G.; JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. **Journal of Virology**, v.73, p.9734-9740, 1999.

CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D.R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in southern Brazil. **The Veterinary Journal**, v.172, p.114-120, 2006.

CORTEZ, A.; CASTRO, A.M.G.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; LEITE, R.C.; SCARCELI, E.; GENOVEZ, M.E.; ALFIERI, A.A.; RICHTZENHAIN, L.J. Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella spp.*, *Leptospira spp.*, herpesvirus bovino e vírus da diarréia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1226-1228, 2006.

CRANE, C. S.; LUKAS, G. N.; WATKINS, W.W. Infectious bovine rhinotracheitis abortion in California beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.144, p.13-18. 1964.

DAVISON A.J. Evolution of Herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.315-324, 2002.

DAVISON. A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; McGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLET, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.; THIRY, E. The order herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, p.171-177, 2009.

DECMAN, V.; FREEMAN, M.L.; KINCHINGTON, P.R.; ROBERT L. HENDRICKS, R.L. Immune Control of HSV-1 Latency. **Viral Immunology**, v. 18, n.3, p.466-473, 2005.

DEKA RAMNEEK, D.; MAITI, N.K.; OBEROI, M.S. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v.24, n.3, p.1085-1094, 2005.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.

DENIS, M.; SPLITTER, G.; PASTORET, P.P.; BABIUK, L.A. Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus 1): helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells. **Cell Mediated Immunity in Ruminants**, CRC Press: Boca Raton, 1994.

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; MÉDICI, K.C.; FREITAS, J.C.; NETO, J.S.F.; MÜLLER, E.E. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v.28, n.3, p.161-168, 2008.

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

DOHNER, K.; WOLFSTEIN, A.; PRANK, U.; ECHEVERRI, C.; DUJARDIN, D.; VALLEE, R.; SODEIK, B. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.2795-2809, 2002.

DREW, T.W.; YAPP, F.; PATON, D.J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.145-154, 1999.

EDWARDS, S.; GITAO, G.C. Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. **Veterinary Microbiology**, v.13, n.2, p.135-141, 1987.

EDWARDS, S.; H. WHITE, H.; P. NIXON, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. **Veterinary Microbiology**, v.22, n.2-3, p.213-223, 1990.

EDWARDS, S.; NEWMAN, R.H.; WHITE, H. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. **British Veterinary Journal**, v.147, p.216-231, 1991.

EGYED, L.; BARENCSI, G.; BARTHA, A. Periodic reappearance of bovine herpesvirus type 4 DNA in the sera of naturally and experimentally infected rabbits and calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, p.199-206, 1999.

ELY, R.W.; D'OFFAY, J.M.; RUEFER, A.H.; CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.487-492, 1996.

ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.67, p.169-174, 1981.

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

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3-15, 1996.

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

ESKRA, L.; SPLITTER, G.A. Bovine herpesvirus-1 infects activated CD4 lymphocytes. **Journal of General Virology**, v.78, p.2159-2166, 1997.

ESPINASSE, J.; GILBERT, Y.; SAURAT, P. Features of bovine rhinotracheitis in a dairy herd in south-western France. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.125, p.1441–1452, 1974.

ESTEVEES, P.A. **Desenvolvimento de um ELISA com antígeno recombinante específico para detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)**. 2001. 88 p. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

ESTEVEES, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; HÜBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v.131, p.16-22, 2008.

FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A. **Veterinary virology**. 2ed., San Diego: Academic, 1993, 676p.

FERNANDES, C.G. Doenças da reprodução. In: RIET-CORREA, F.; S CHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C. **Doença de ruminantes e eqüinos**. Pelotas: Ed. Universitária/UFPEL, 1998. 651p.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, 888p.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. *Herpesviridae*. In: FLORES, E.F. (Eds.) **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, cap.17, p.433-488.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.216-221, 1962.

FRERICHS, G.N.; WOODS, S.B.; LUCAS, M.H.; SANDS, J.J. Safety and efficacy of live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. **Veterinary Record**, v.111, p.116-122. 1982.

FUCHS, M.; HÜBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA, H.J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wildtype virus and virus lacking glycoprotein E. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2498-2507, 1999.

FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M.; OSAME, S.; MATSUI, T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. **Acta Neuropathologica**, v.90, p.565-571, 1995.

GALEOTA, J.A.; FLORES, E.F.; KIT, S.; KIT, M.; OSORIO, F.A. A quantitative study of the efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 differential vaccine in reducing the establishment of latency by wildtype virus. **Vaccine**, v.15, p.123-128, 1997.

GALVÃO, C.L.; DORIA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto de Biologia da Bahia**, Salvador, v.6, p.15-25, 1963.

GEE, A.L.W.; WAGTER, L.H.A.; HAGE, J.J. The use of polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.163-168, 1996.

GEISER, V.; INMAN, M.; ZHANG, Y.; JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. **Journal of General Virology**, v.83, p.2965-2971, 2002.

GEISER, V.; ZHANG, Y.; JONES, C. Analysis of a bovine herpesvirus 1 recombinant virus that does not express the bICP0 protein. **Journal of General Virology**, v.86, p.1987-1996, 2005.

GERDTS, V.; BEYER, J.; LOMNICZI, B.; METTENLEITER, T.C. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. **Journal of Virology**, v.74, p.817-827, 2000.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses Part I. **Veterinary Bulletin**, v.47, p.317-343, 1977.

GILLESPIE, J.H.; McENTEE, K.; KENDRICK, J.W.; WAGNER, W.C. Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Cornell Veterinary**, v.49, p.288-297, 1959.

GRAHAM, D.A.; MAWHINNEY, K.A.; MCSHANE, J.; CONNOR, T.J.; ADAIR, B. M.; MERZA, M. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, n.1, p.24-31, 1997.

GRÉGIO, C.R.V.; ANDRADE, C.M.; TRÉS, J.E.; SANTOS, J.C.B.; SOUZA FILHO, R.S. Profile of neutralizing serum antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle in Rio de Janeiro state. **Virus Reviews and Research**, v.3, p.77, 2000.

GUARINO, H.; NÚÑEZ, A.; REPISO, M.V.; GIL, A.; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v.85, p.34-40, 2008.

GÚERIN, B.; LE GUIENNE, B.; CHAFFAUX, S.; HARLAY, T.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryons fécondes "in vitro" après infection expérimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1 (BoHV-1). **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.165, p.827-833, 1989.

GUY, J.S.; POTGIETER, N.D.; McCracken, M.; MARTIN, W. Isolation of bovine herpesvirus-1 from vesicular lesions of bovine udder. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.783-785, 1984.

GOURLAY, R.N.; STOTT, E.J.; ESPINASSE, J.; BARLE, C. Isolation of *Mycoplasma agalactiae* var. bovis and infectious bovine rhinotracheitis virus from an outbreak of mastitis in France. **Veterinary Record**, v.95, p.534-535, 1974.

HAGE, J.J.; VELLEMA, P.; SCHUKKEN, Y.H.; BARKEMA, H.W.; RIJSEWIJK, F.A.; VAN OIRSCHOT, J.T.; WENTINK, G.H. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.41-54, 1997.

HAGE, J.J.; SCHUKKEN, Y.H.; DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; VAN VALKENGOED, P.H.; WENTINK, G.H. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. **Preventive Veterinary Medicine**, v.34, p.97-106, 1998.

HALE, A.D.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. **Journal of Virological Methods**, v.57, 195-201, 1996.

HENDERSON, G.; PERNG, G.C.; NESBURN, A.B.; WECHSLER, S.L.; JONES, C. The latency related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. **Journal of Neurovirology**, v.10, p.64-70, 2004.

HERRING, A.J.; NETTLETON, P.F.; BURRELLS, C. A micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. **Veterinary Record**, v.107, n.7, p.155-156, 1980.

HIGGINS, R.J.; EDWARDS S. Systemic neonatal infectious bovine rhinotracheitis virus infection in suckler calves. **Veterinary Record**, v.119, p.177-178, 1986.

HINKLEY, S.; AMBAGALA, A.P.; JONES, C.J.; SRIKUMARAN, S. A VHS-like activity of bovine herpesvirus-1. **Archives of Virology**, v.145, n.2027-2046, 2000.

HOLZ, CL.; CIBULSLI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v.29, n.9, 767-773, 2009.

HOMAN, E.J.; EASTERDAY, B.C. Experimental latent and recrudescence bovine herpesvirus-1 infection in calves. **American Journal Veterinary Research**, v.44, n.2, p.309-313, 1983.

HORIUCHI, M.; YAMAZAKI, 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. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.57, p.577-580, 1995.

HYNDMAN, L.; VILCEK, S.; CONNER, J.; NETTLETON, P.F. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. **Journal of Virological Methods**, v.71, p.69-76, 1998.

ICTV, International Committee of Taxonomy of Viruses. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_herpe.htm> Acesso em 31 jul 2010.

INTISAR, K.S.; ALI, Y.H.; KHALAFALLA, A.I.; RAHMAN-MAHASIN, E.A.; AMIN, A.S. Natural exposure of dromedary camels in Sudan to infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus-1). **Acta Tropica**, v.111, p.243–246, 2009.

JENSEN, R.; GRINER, L.A.; CHOW, T.L.; BROWN, W.W. Infectious rhinotracheitis in feedlot cattle. **Proceedings of the U.S. Livestock Sanitary Association**, 59th Annual Meeting, p.189-199, 1955.

JONES, C.; NEWBY, T.J.; HOLT, T.; DOSTER, A.; STONE, M.; CIACCI-ZANELLA, J.; WEBSTER, C.J.; JACKWOOD, M.W. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106). **Vaccine**, v.18, p.3185-3195, 2000.

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Review**, v.16, n.1, p.79-95, 2003.

JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PEREZ, S.; ZHANG, Y. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.199-210, 2006.

KAASHOEK, M.J.; STRAVER, P.H.; VAN, R.E.; QUAK, J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. **Veterinary Record**, v.139, p.416-421, 1996

KAMPA, J.; STÅHL, K.; MORENO-LÓPEZ, J.; CHANLUN, A.; AIUMLAMAI, S.; ALENIUS, S. BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern Thailand. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.45, p.181-192, 2004.

KASTELIC, J.P. Noninfectious embryonic loss in cattle. **Veterinary Medicine**, v.79, n.12, p.584-589, 1994.

KATARIA, R.S.; TIWARI, A.K.; GUPTA, P.K.; MEHROTRA, M.L.; RAI, A.; BANDYPADHYAY, S.K. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. **Acta Virologica**, v.41, p.311-315, 1997.

KENDRICK, J.W.; YORK, C.W.; MCKERCHER, D.G. A controlled field trial of a vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. **Proceedings of the United States Livestock Sanitary Association**, v.60, p.155-158, 1956.

KENDRICK, J.W.; STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.28, p.1269-1282, 1967.

KENDRICK, J.W.; SCHNEIDER, L.; STRAUB, O.C. Placental reaction to the infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, p.1045-1051, 1971.

KENDRICK, J.W.; Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.163, p.852-854, 1973.

KENNEDY, P.C.; RICHARDS, W.P.C. The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis. **Path. Vet.**, v.1, p.7-17, 1964.

KIBENGE, F.S.B.; MCKENNA, P.K.; WADOWSKA, D.; YASON, C.V. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.9, p.1206-1212, 1994.

KIRKBRIDE, C.A. Managing an outbreak of livestock abortion - 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v.80, n.5, p.70-79, 1985.

KIRKBRIDE, C.A. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.374-379, 1992.

KÖNIG, P.; BEER, M.; MAKOSCHEY, B.; TEIFKE, J.P.; POLSTER, U.; GIESOW, K.; KEIL, G.M. Recombinant virus-expressed bovine cytokines do not improve efficacy of a bovine herpesvirus 1 marker vaccine strain. **Vaccine**, v.22, p.202-212, 2003.

KRAHL, M.; BRAGA, A.C.; OLIVEIRA, L.G.; PIRES NETO, J.A.S.; PRADO, J.A.P.; ROSA, J.C.A.; WUNDER Jr., E. Pesquisa de anticorpos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997, Gramado, Brasil, p.174.

KRAMPS, J.A.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; WEERDMEEESTER, K.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; RIJSEWIJK, F.A.; KEIL, G.; VAN OIRSCHOT, J.T. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.9, p.2175-2181, 1994.

KRAMPS, J.A.; PERRIN, B.; EDWARDS, S.; VAN OIRSCHOT, J.T. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.153-161, 1996.

KRAMPS, J.A.; BANKS, M.; BEER, M.; KERKHOF, P.; PERRIN, M.; WELLENBERG, G.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Veterinary Microbiology**, v.102, p.169-181, 2004.

LANGONI, H.; PAES, A.C.; TONIN, F.B.; SILVA, A.V.; DENARDI, M.B. Prevalence of BVD, IBR and PI3 in bovine by ELISA test. In: **Encontro Nacional de Virologia**, Sociedade Brasileira de Virologia, 1995, Ribeirão Preto, Brasil.

LARSON, B.L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. **Veterinary Medicine**, v.81, p.478-486, 1996.

LAWRENCE, T.L.J.; FOWLER, V.R. **Growth of farm animals**. Wallingford: CAB International, 1997, 330p.

LEMAIRE, M.; MEYER, G.; BARANOWSKI, E.; SCHYNTS, F.; WELLEMANS, G.; KERKHOF, P.; THIRY, E. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.4233–4238, 2000.

LOMBA, F.; VASCOBOINIC, E.; ZYGRAICH, N. Immunization of pregnant cows with a temperature-sensitive mutant of the IBR. In: **Virus International Congress**, Diseases of Cattle, Paris, France, 1976, p. 395-399.

LOVATO, L. T. WEIBLEIN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n.3, p.425-430,1995.

LUKAS, G.N.; WEIDENBACH, S.J.; PALMER, K.G.; DICKIE, C.W.; DUNCAN; R.F.; BARRERA, J. A bovine fetal viral isolate neutralized by IBR immune serum as a cause of abortion in cattle. **Proceedings of U.S. Livestock Sanitary Association**, v.67, p.108-128, 1963.

MADICK, J.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Isotype-specific antibodies responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.46, p.267-283, 1995.

MADIN, S.H.; YORK, C.J.; MCKERCHER, D.G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, v.124, p.721, 1956.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; VAN MAANEN, C.; HAGE, J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.1–13, 2000.

MASRI, S.A.; OLSON, W.; NGUYEN, P.T.; PRINS, S.; DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.60, p.100-107, 1996.

McKERCHER, D.G.; MOULTON, J.E.; JASPER, D.E. Virus and virus-like cattle disease entities new to California. **Proceedings of the U.S. Livestock Sanitary Association**, 58th Annual Meeting, p. 260, 1954

McKERCHER, D.G.; STRAUB, O.C.; SAITO, J.K.; WADA, E.M.. Comparative studies of the etiological agents of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.23, p.320-328, 1959.

McKERCHER, D. C.; WADA, E.M.. The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.144, p.136-142, 1964.

MECHOR, G.D.; ROUSSEAUX, C.G.; RADOSTITS, O.M.; BABIUK, L.A.; PETRIE, L. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.51, p.452-459, 1987.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; BEUTTEMMÜLLER, E.A; OLIVEIRA, R.R.; DUCATTI, S.O. Evidência sorológica da infecção de bovinos de corte pelo herpesvírus bovino 1 na região de Londrina, PR. In: **Panamerican Association of Veterinary Sciences**, 1996, Campo Grande. Brasil, p. 261.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p.347-350, 2000.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.P. Prevalência de anticorpos contra herpesvírus bovino-1, vírus da diarréia bovina a vírus e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do estado de Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21. n.2, p.160-161, 1997.

MELO, C.B.; AZEVEDO, E.O.; ALFARO, C.E.P.; LOBATO, Z.I.P.; LOBATO, F.C.F.; LEITE, R.C. Anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino 1 (HVB-1) em bovinos do sertão da Paraíba. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 2, n.1, p.43-44, 1999.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, v.76, n.4, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER T.C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, v.92, p.197-206, 2003.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.423-429, 2006.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, n.3-4, p.205-217, 1986.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, n.4, p.633-52, 2001.

MILLER, N.J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.126, p.463-467, 1955.

MILLER, J.M., VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.4, p.790-794, 1984.

MILLER, J.M., VAN DER MAATEN, M.J. Experimentally induced bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.223-228, 1986.

MILLER, J.M. Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus -1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.11, p.292-301, 1987.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; VAN DER MAATEN, M.J. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA, **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.458-461, 1991.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; BELLO, L.J.; LAWRENCE, W.C.; WHITBECK, J.C. Abortion in heifers inoculated with a thymidine kinase-negative recombinant of bovine herpesvirus 1. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.7, p.870-874, 1995.

MISRA, V.; WALKER, S.; HAYES, S.; O'HARE, P. The bovine herpesvirus alpha gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. **Journal of Virology**, v.69, n.9, p.5209-5216, 1995.

MOLELLO, J.A.; CHOW, T.L., OWEN, N.; JENSEN, R. Placental pathology V. Placental lesions of cattle experimentally infected with infectious bovine rhinotracheitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.27, p.907-915, 1966.

MOLLEMA, L.; RIJSEWIJK, F.A.; NODELIJK, G.; de JONG, M.C. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*Cervus elaphus*) under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.25-34, 2005.

MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.145-153, 2000.

MUELLER. S.B.K.; IKUNO, A.A.; CAMPOS, M.T.G.R.; RIBEIRO, L.O.C. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 45, n.3, p. 187-190, 1978.

MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; MACHADO, J.S. LIMA, R. M. A.; RICHTZENHAIN, L.J.; TAKI, E.M. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.47, n.2, p.55-59, 1981.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3ed., New York: Academic Press, 1999, 629p.

MURRAY, R.D. A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. **Veterinary Record**, v.127, p.543-547, 1990.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, F.S.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v.38, p.181-209, 2007.

MWEENE, A.S.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.44, p.165-174, 1996.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v.10, n.1, p. 85–98, 2009.

NAWAL, M.A.Y.; GABRY, G.H.; HUSSEIN, M.; Omayma, A.A.S. Occurrence of parainfluenza type 3 and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) viruses (mixed infection) among camels. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v.81, n.2, p.781–791, 2003.

NOGUEIRA, F.R.C.; CAMARGO, A.J.R.; RESENDE, D.A. **Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa bovina no Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-RIO), 1986. p. 1-5 (Comunicado Técnico, n.167).

NYAGA, P.N.; McKERCHER, D.G. Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.2, p.587–602, 1979.

OBANDO, C.; BAULE, C.; PEDRIQUE, C.; VERACIERTA, C.; BELÁK, S.; MERZA, M.; MORENO-LOPEZ, J. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.40, n.3, p.253-262, 1999.

ORMSBEE, R. W. IBR and abortion. **California Veterinarian**, v.17, p.23-28, 1963.

OWEN, N.W.; CHOW, T.L.; MOLELLO, J.A. Bovine fetal lesions experimentally produced by infections bovine rhinotracheitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, p.1617-1625, 1964.

PARSONSON, I.M.; SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.365-369, 1975.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annales de recherches vétérinaires**, v.13, n.3, p.221-235, 1982.

PENNY, C.D.; HOWIE, F.; NETTLETON, P.F.; SCHOCK, A. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. **Veterinary Record**, v.151, p.89-91, 2002.

PERRIN, B.; BITSCH, V.; CORDIOLI, P.; EDWARDS, S.; ELOIT, M; GUÉRIN, B.; LENIHAN, P.; PERRIN, M.; RØNSHOLT, L.; VAN OIRSCHOT, J.T. A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties**, v.12, n.3, p.969-984, 1993.

PETZOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; PRADO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.C.; WALD, V.B.; ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.184-187, 2001.

PIDONE, C.L.; GALOSI, C.M.; ECHEVERRIA, M.G.; NOSETTO, E.O.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Restriction Endonuclease Analysis of BHV-1 and BHV-5 Strains Isolated in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.46, n.7, p.453-456, 1999.

PITUCO, E.M. **Ocorrência da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos / vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. Utilização das reações sorológicas de microsoroneutralização, microhemoaglutinação passiva e da imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus bovino-1.** 74 p. Dissertação de mestrado - Mestrado em Patologia Bovina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

POSPISIL, Z.; KREJČÍ, J.; JÍNEK, P.; LÁNY, P.; ZENDULKOVÁ, D.; CÍHAL, P. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.199-206, 1996.

RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.D.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.17, p.89-95, 1989.

RIBEIRO, M.B.; ALICE, F.J.; BRANCO, M.B.C. Prevalência de anticorpos para a rinotraqueíte infecciosa dos bovinos na Bahia. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1982, Camboriú, Brasil, p. 81.

RIBEIRO, M. B.; GALVÃO, C.L.; COSTA, A.R.; RODRIGUES, F.M.; SUZART, J.C.C. **Infecções pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina / vulvovaginite pustular infecciosa, diarreia viral bovina e paraintluenza 3, detectadas por meio de avaliação sorológica no estado da Bahia.** Boletim n.11, Salvador: Embrapa, 1987, 30 p.

RICHTZENHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A.; LEITE, R.C.; WEIBLEN, R.; MORO, E.; UMEHARA, O. Pesquisa de anticorpos séricos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1) em fêmeas bovinas de propriedades com histórico de problemas reprodutivos localizados em 21 Estados brasileiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.66, p.127, 1999.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.2, p.223-232, 1996.

ROBERTS, A.W.; CARTER, G.R.; CARTER, F.A. Infectious bovine rhinotracheitis virus recovered from milk of a cow with mastitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.164, p.413. 1974.

ROCHA, M.A. BARBOSA, E.F.; GUIMARÃES, S.E.F.; DIAS NETO, E.; GOUVEIA, A.M.G. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.1.-11, 1998a.

ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUEDES, R.M.C.; LAGE, A.P.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.M.G. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay. **Veterinary Research Communications**, v.23, p.133-141, 1998b.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LEITE, R.C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.373-380, 1999.

ROEHE, P.M.; ALMEIDA, R.S.; TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; OLIVEIRA, E.A.S.; PETZHOLD, S.A.; SILVA, T.C. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.59, n.2, p.27-32, 1997.

ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; MELO, S.V.; ALMEIDA, R.S.; D'ARCE, R.C.F.; SILVA, T.C.; LEMOS, R.A.; OLIVEIRA, L.G. Situação do BHV-1 E BHV-5 no Brasil. In: **Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)**, 1998, Santa Maria, Brasil.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, v.146, p.586-588, 2000.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-448, 1992.

ROIZMAN, B.; KNIPE, M.D. Herpes simplex virus and their replication. In: KNIPE, M.D., HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. 4 Ed. United States: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2001, cap.71, p.2399 – 2461.

ROIZMAN, B., PELLET, P.E. The family herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Field's Virology**, 4 Ed. United States: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2001, cap.71, p.2381-2398.

ROMERA, S.A.; HILGERS, L.A.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.I.; ALCON, V.L.; DUS SANTOS, M.J.; BLANCO VIERA, J.; BORCA, M.V.; SADIR, A.M. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. **Vaccine**, v.19, p. 132-141, 2000.

RUHNKE, H.L.; PAIMER, N.C.; DOIG, P.A.; MILLER, R.B. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. **Theriogenology**, v.21, p.295-301, 1984.

RUSVAI, M.; FODOR, L. Occurrence of some viruses and bacteria involved in respiratory diseases of ruminants in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.46, p.405-414, 1998.

SANTURDE, G.; DA SILVA, N.; VILLARES, R.; TABARES, E.; SOLANA, A.; BAUTISTA, J.M.; CASTRO, J.M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.49, p.81-92, 1996.

SAYDAM, O.; STEINER, F.; VOGT, B.; SCHWYZER, M. Host cell targets of immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.185-192, 2006.

SCHROEDER, R.J.; MOYS, M.D. An acute respiratory infection of dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.125, p.471-472, 1954.

SCHYNTS, F.; BARANOWSKI, E.; LEMAIRE, M.; THIRY, E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wild type bovine herpesvirus type 1 strains. **Veterinary Microbiology**, v.66, n.3, p.187-195, 1999.

SCICLUNA, M.T.; CAPRIOLI, A.; SARALLI, G.; MANNA, G.; BARONE, A.; CERSINI, A.; CARDETI, G.; CONDOLEO, R.U.; AUTORINO, G.L. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection? **Veterinary Microbiology**, v.43, n.1, p.81-88, 2010.

SCHANG, L.M.; HOSSAIN, A.; JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. **Journal of Virology**, v.70, p.3807-3814, 1996.

SINGH, E.L.; HARE, W.C.D.; THOMAS, F.C.; BIELANSKI, A. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. **Theriogenology**, v.20, p.169–176, 1983.

SILVA, F.F.; CASTRO, R.S; MELO, L.E.H; ABREU, S.R.O; MUNIZ, A.M.M. Anticorpos neutralizantes contra o HVB-1 em bovinos do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 4, p. 597-599. 1995.

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 the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, Netherlands, v.129, p.191–199, 2007.

SIX, A.; BANKS, M.; ENGELS, M.; BASCUNANA, C.R.; ACKERMANN, M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Archives of Virology**, v.146, p.1325-1335, 2001.

SMITH, V.W.; COAKLEY, W.; MAKER, D. Transmission of a genital isolate of bovine herpesvirus 1 to calves by the respiratory route. **Australian Veterinary Journal**, v.56, p.302–304, 1980.

SMITH, G.H.; COLLINS, J.K.; CARMAN, J. Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.39-44, 1989.

SMITH, G.A.; YOUNG, P.L.; REED, K.C. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, v.140, p.599-603, 1995.

SMITH, G.A.; GROSS, S.P.; ENQUIST, L.W. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.98, p.3466-3470, 2001.

SOLIS-CALDERON, J.J., SEGURA-CORREA, V.M., SEGURA-CORREA, J.C., ALVARADO-ISLAS, A. Seroprevalence and risk factors for IBR in beef cattle herds in Yucatán, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v.57, p.199–208. 2003.

SOUZA, V.E.; BEZERRA, D.C.; CHAVES, N.P.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M. frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da ilha de São Luís-MA. In: **Congresso Brasileiro de Buiatria, Ciência Animal Brasileira**, 2009, Sup.1, p.491-495.

SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, v.4, n.1, p.167–180, 1993.

SPIPKI, F.R. **Patogenicidade e vacinologia de amostras brasileiras de herpesvírus bovino tipo 1**. 2004. 102 p. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SPIPKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; LIMA, M.; FRANCO, A.C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P.M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v.24, p.43–49, 2004.

SPIPKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**, v.129, p.191-193, 2005.

SPIRE, M.F.; EDWARDS, J.F.; LEIOLD, H.W.; CORTESE, V.S. Absence of ovarian lesions in IBR seropositive heifers subsequently vaccinated with a modified live IBR virus vaccine. **Agri-Practice Medicine**, v.16., n.7, p.33-38, 1995.

STAHL, K.; RIVERA, H.; VAGSHOLM, I.; MORENO-LOPEZ, J. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v.56, p.193-202. 2002.

STILWELL, G.; MATOS, M.; CAROLINO, N. Seroprevalence of antibodies to four respiratory viruses in beef herds of the Ribatejo region of Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, n.561-562, p.97-105, 2007.

STRAUB, O.C.; MÄCKLE, N. Ein Ausbruch des Blaeschenauschlages in einer Besamungsstation. **Tierärztliche Umschau**, v. 20, p. 113-116, 1965.

STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: DINTER, Z.; MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990, v.3, p.71-108.

STRAUB, O.C. BHV 1 infection: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, v.14, p.175-186, 1991.

STRAUB, O.C. Advances in BoHV-1 (IBR) research. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.108, p.419-422, 2001.

STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v.125, p.584, 1989.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi Nested-PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.43-56, 2003.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v.79, p.85–88, 2005.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinária Gaucha**, Brasil, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; DOTTA, M.A.; ROEHE, P.M. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v.21, n.1, p.33-37, 2001.

THIRY, E.; BROCHIER, B.; SALIKI, J.; PIRAK, M.; PASTORET, P.P. Excretion and reexcretion of thermosensitive and wild-type strains of infectious bovine rhinotracheitis virus after co-infection or two successive infections. **Veterinary Microbiology**, v.10; p.371-380, 1985.

THIRY, E.; SALIKI, J.; BUBLOT, M.; PASTORET, P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.10, n.1, p.59-63, 1987.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v.37, p.169-190, 2006.

THIRY, J.; WIDÉN, F.; GRÉGOIRE, F.; LINDEN, A.; BELÁK, S.; THIRY, E. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **BioMed Central Veterinary Research**, v.3, n.26, p.1-11, 2007.

TIKOO, S.K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in virus research**, v.45, p.191-223, 1995.

TONIN, F.B.; LANGONI, H.; PAES, A.E.; DA SILVA, A.V. Prevalence of IBR and BVD/MD in bovine by ELISA test. In: **Panamerican Association of Veterinary Sciences**, 1996. Campo Grande. Brasil, p.277

TURIN, L.; RUSSO, S.; POLI, G. BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. **Molecular Medicine**, v.5, p.261-284, 1999.

TURIN, L.; RUSSO, S. BHV-1 infection in cattle: an update. **Veterinary Bulletin**, v.73, p.16-21, 2003.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GIFFORD, G.A.; BABIUK, L.A. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. **Vaccine**, v.8, p.358-368, 1990.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S.K.; VAN DEN HURK, J.V.; BABIUK, L.A.; J VAN DONKERSGOED, N.D. Protective immunity in cattle following vaccination with conventional and marker bovine herpesvirus-1 (BHV1) vaccines. **Vaccine**, v.15, p.36-44, 1997.

VAN DER POEL, W.H.; KRAMPS, J.A.; QUAK, J.; BRAND, A.; VAN OIRSHOT, J.T. Persistence of bovine herpesvirus 1 specific antibodies in cattle after intranasal vaccination with a live virus vaccine. **Veterinary Record**, v. 137, p. 347-238, 1995.

VAN ENGELBURG, F.A.; MAES, R.K.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.

VAN OIRSCHOT, J. T.; STRAVER, P. J.; VAN LIESHOUT, J. A.; QUAK, J.; WESTENBRINK, F.; VAN EXSEL, A. C. A subclinical infection of bullswith bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination center. **Veterinary Record**, v.132, p.32-35,1993.

VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A.; STRAVER, P. J.; RUULS, R. C.; QUAK, J.; DAVIDSE, A.; WESTENBRINK, F.; GIELKENS, A. L.; VAN DIJK, J. E.; MOERMAN, A. Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull. **Veterinary Record**, v.137, n.10, p.235-239, 1995.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; STEGEMAN, J.A. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, v.44, n.1-3, p.75-81, 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**, v.73, p.195-205. 1999

VAN SCHAIK, G.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A.A.; BENEDICTUS, G. Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: a case-control study. **Veterinary Quartely**, v.23, p.71-76. 2001.

VAN SCHAIK, G.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A.A.; BARKEMA, H.W.; BENEDICTUS, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Preventive Veterinary Medicine**, v.54, p.279-289. 2002.

VAN WUIJCKHUISE, L.; BOSCH, J.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; ELBERS, A.R. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. **Veterinary Records**, v.142, n.8, p.181-184, 1998.

VARELA, A.P.M.; HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; ANTUNES, D.A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DENZEN, D.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v.142, p.254-260, 2010.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.3. p.421-424, 1995.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; HERRING, J.A.; HERRING, A.J. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.42, p.53-64, 1994.

VONK NOORDEGRAAF, A.; LABROVIC, A.; FRANKENA, K.; PFEIFFER, D.U.; NIELEN, M. Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. **Preventive Veterinary Medicine**, v.62, n.1, p.51-58, 2004.

WAGNER, W.C.; GILLESPIE, J.H. Comparative studies of a Canadian strain with New York strain of infectious pustular vulvovaginitis virus and with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Cornell Veterinary**, v.49, p.409-410, 1959.

WAGTER, L H.A.; GLAS, R.D.; BLEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELBURG, F.A.; RIJSEWIJK, F.A.; HOUWERS, D.J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine semen. **Veterinary Research Communication**, v.20, p.401-408, 1996.

WANG, C.; SPLITTER, G.A. CD4+ cytotoxic T-limphocyte activity macrophages pulsed with bovine herpesvirus 1 polypeptides. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7040-7047, 1998.

WANG, J.; HORNER, G.W.; O'KEEFE, J.S. Genetic characterisation of bovine herpesvirus 1 in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.54, n.2, p.61-66, 2006.

WEIBLEN ,R.; KREUTZ, L.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E. Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.24, n.8, p.773-775, 1991.

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; SCHUCH, L. F.; REBELATTO, M. C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, n.3, p.341-343, 1992.

WEIDMANN, M.; WAGNER, P.; DUBOVI, E.J.; BATT, C.A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v.44, p.129-140, 1993.

WELLENBERG, G.J.; MARS, M.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.78, n.1, p.79-84, 2001.

WELLENBERG, G.J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.27-45, 2002.

WHETSTONE, C.A.; MILLER, J.M. Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. **Archives of Virology**, v.107, p.27-34, 1989.

WIEDBRAUK, D.L.; WERNER, J.C.; DREVON, A.M. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, 2643–2646, 1995.

WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology**, v.74, p.5337-5346, 2000.

WIRTH, U.V.; FRAEFEL, C.; VOGT, B.; VLCEK, C.; PACES, V.; SCHWYZER, M. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. **Journal of Virology**, v.66, p.2763-2772, 1992.

WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e da Diarréia a vírus-enfermidade das mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Guaíba, v.1, n.1, p.52-58, 1972.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.1-72.

YAN, B.F.; CHAO, Y.J.; CHEN, Z.; TIAN, K.G.; WANG, C.B.; LIN, X.M.; CHEN, H.C.; GUO, A.Z. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.136-141, 2008.

YASON, C.V.; HARRIS, L.M.; McKENNA, P.K.; WADOWSKA, D.; KIBENGE, F.S. Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.59, p.94-101, 1995.

YATES, D.W.G. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.225–263, 1982.

YORK, C.J.; SCHWARZ, A.J.F.; ESTELA, L.A. The isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.94, p.740-744, 1957.

ZHENG, C.; BROWNLIE, R.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. **Virology**, v.324, p.327-339, 2004.

ZHOU, J.; LYAKU, J.; FREDRICKSON, R.A.; KIBENGE, F.S.B. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. **Journal of Virological Methods**, v.79, p.181-189, 1999.

ZYGRAICH, N.; LOBMANN, M.; VASCOBOINIC, E.; BERGE, E.; HUYGELEN, C. In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. **Research in Veterinary Science**, v.16: p.328-335. 1974.