

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS
DE BOVINOS E AVALIAÇÃO DE UM HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5
RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO VACINAL**

Autor: FABRÍCIO SOUZA CAMPOS

Orientador: PAULO MICHEL ROEHE

Porto Alegre, Setembro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS DE
BOVINOS E AVALIAÇÃO DE UM HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5
RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO VACINAL

Autor: Fabrício Souza Campos

Tese apresentada como requisito ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias, área de Microbiologia Veterinária, especialidade de Virologia.

Orientador: Paulo Michel Roehle.

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

CAMPOS, FABRICIO SOUZA
DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS EM GÂNGLIOS
TRIGÊMEOS DE BOVINOS E AVALIAÇÃO DE UM HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 5 RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO VACINAL /
FABRICIO SOUZA CAMPOS. -- 2012.
96 f.

Orientador: PAULO MICHEL ROEHE.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2012.

1. Bovine herpesvirus. 2. BoHV-2. 3. BoHV-4. 4.
BoHV-5. 5. OvHV-2. I. ROEHE, PAULO MICHEL, orient.
II. Título.

Fabrcio Souza Campos

DETECCÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS DE BOVINOS E AVALIAÇÃO DE UM HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO VACINAL

Aprovada em 17 SET 2012

APROVADA POR:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehc
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

“Em memória de Franciscus Antonius Maria Rijsewijk, por todos os ensinamentos;
pela amizade e convivência; e pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Paulo Michel Roehle e a Profa Dra. Ana Cláudia Franco pela oportunidade, anos de convivência e aprendizado; por toda paciência, “puxões de orelha” e sábias sugestões; pela amizade, apoio e confiança em mim depositada nas diferentes fases da realização deste trabalho. Também agradeço ao Prof. Dr. Fernando Spilki pela amizade e por todo apoio. Obrigado aos três por serem exemplos de seriedade, entusiasmo e dedicação à pesquisa.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Virologia da FEPAGRO/IPVDF e ICBS/UFRGS: Ale, Ana Paula, Camila, Candice, Catarina, Cenci, Dadá, Daniele, Dinler, Diógenes, Elle, Esmale, Felipe, Fernanda, Fernando, Gustavo(s), Helton, Hiran, Jamile, Jarbas, Josiane, Juliana, Lilian, Lissandra, Luciana, Marcos, Marcus, Martha, Monique, Nathalia, Paulinho, Rafaela, Rhayssa, Samuel, Thais, Thalita pela convivência, auxílio nos momentos importantes e alegrias ao longo da realização deste trabalho.

Aos membros da banca (Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal, Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon e ao Prof. Dr. Fernando Spilki) por aceitarem a incumbência de compor a banca e pelas devidas correções.

À minha esposa Tiane, um especial agradecimento por todo amor, carinho, dedicação e paciência em todos esses anos de convivência. Agradeço também aos seus pais, Eloíno e Ivany, por todo apoio e admiração.

A todos meus familiares, em especial a minha mãe Ana Maria, meu pai Antônio e minhas queridas irmãs: Lê, Bia e Carlinha (e cunhados: Evandro, Vitor e Forner), que apesar de “distantes”, sempre me apoiaram durante o desenvolvimento e conclusão deste trabalho e nunca mediram esforços para que eu pudesse continuar. Agradeço por todo amor e apoio incondicional.

Aos amigos Eduardo Dornelles, Fabrício Torres, Sabrina Salamoni e Siumar Tironi por todo apoio e recíproca admiração.

Às instituições: FEPAGRO e UFRGS, ícones na geração do saber e que mantém as portas abertas para a execução deste trabalho.

Aos funcionários, professores, colegas destas instituições, muitíssimo obrigado.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio a realização deste estudo.

DETECÇÃO DE DNA DE HERPESVÍRUS EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS DE BOVINOS E AVALIAÇÃO DE UM HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO VACINAL

Autor: Fabrício Souza Campos¹

Orientador: Paulo Michel Roehle

RESUMO

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2), 4 (BoHV-4), 5 (BoHV-5) e o herpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2) apresentam como característica comum a indução de infecções latentes em seus hospedeiros. Estes agentes estão associados a diferentes enfermidades em bovinos, embora na maioria dos animais infectados a infecção primária ocorra com poucos ou sem sinais clínicos evidentes. Eventualmente, hospedeiros suscetíveis podem apresentar quedas na produtividade, perdas reprodutivas ou mesmo sofrer doença fatal. Esta tese compreende dois estudos independentes, que visam contribuir para um maior conhecimento sobre infecções por herpesvírus em bovinos. O primeiro capítulo reporta os achados de uma pesquisa sobre a presença do DNA de BoHV-2, BoHV-4 e OvHV-2 em gânglios trigêmeos (GT) de bovinos. Fragmentos de 200 GT (de 100 animais) foram coletados e submetidos à extração de DNA. Um conjunto de PCRs, duas das quais “semi-nested”, foi padronizado para amplificar parte do gene que codifica a glicoproteína B de BoHV-2 e BoHV-4. Outra PCR foi desenhada tendo como alvo o gene que codifica a proteína FGAM-sintase de OvHV-2. Controles internos foram construídos e utilizados para determinar a sensibilidade dos testes. Genomas de BoHV-2 foram encontrados em 2% (2/100) das amostras analisadas; genomas de BoHV-4 e OvHV-2 não foram detectados. No segundo capítulo desta tese, na busca de um imunógeno capaz de minimizar as perdas decorrentes de encefalites causadas por BoHV-5, o potencial imunogênico de uma amostra recombinante de BoHV-5, da qual os genes que codificam as glicoproteínas I, E e a proteína US9 foram deletados (BoHV5 *gI/gE/US9*), em uma formulação vacinal inativada. Para a avaliação da vacina, oito terneiros (grupo vacinado; GV) foram vacinados com 3 ml da preparação por via subcutânea nos dias 0 e 28. Outros quatro terneiros foram vacinados com a preparação vacinal sem antígeno (grupo controle; GC). Após o desafio com o vírus parental selvagem (EVI 88/95), os animais do GV apresentaram sinais leves de infecção respiratória, enquanto que os animais do GC desenvolveram doença respiratória e encefalite grave, o que levou à eutanásia de dois dos quatro animais controle. A vacina conferiu proteção contra encefalite nos animais do GV após o desafio, porém não impediu a reativação do vírus selvagem. Os estudos aqui realizados permitiram demonstrar pela primeira vez a ocorrência de co-infecções com BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5, mas não com BoHV-4 e OvHV-2, em gânglios trigêmeos de bovinos. No segundo capítulo, foi demonstrada a eficácia do recombinante BoHV5 *gI/gE/US9*, na proteção de bovinos contra encefalites causadas por BoHV-5 selvagem.

¹Tese de doutorado, Doutorado em Ciências Veterinárias, Microbiologia Veterinária, Virologia, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (96 p.) Setembro, 2012.

DETECTION OF HERPESVIRUSES DNA IN TRIGEMINAL GANGLIA OF BOVINE AND EVALUATION OF A RECOMBINANT BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 (BOHV-5) RECOMBINANT AS INACTIVATED VACCINAL ANTIGEN

Author: Fabrício Souza Campos

Supervisor: Paulo Michel Roehle

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2), 4 (BoHV-4), 5 (BoHV-5) and ovine herpesvirus type 2 (OvHV-2) are known to induce latent infections in their natural hosts. These agents are associated with different diseases in cattle, although in the majority of infected animals, primary infections occur with few or no evident clinical signs. Eventually, susceptible hosts may display decreased productivity, reproductive losses or undergo fatal disease. This thesis comprises two studies intended to increase the knowledge on herpesvirus infections in cattle. The first chapter reports the findings of a search for DNA of BoHV-2, BoHV-4 and OvHV-2 in trigeminal ganglia (TG) of cattle. Fragments of 200 TG (from 100 animals) were collected and submitted to DNA extraction. A set of PCRs, two of which "semi-nested" was standardized to amplify a portion of the gene encoding the BoHV-2 and BoHV-4 glycoprotein B. Another PCR was designed targeting the gene coding for the FGAM-synthase of OvHV-2. Internal controls were constructed and used to determine the sensitivity of the tests. BoHV-2 genomes were found in 2% (2/100) of the examined samples. Genomes of BoHV-4 and OvHV-2 were not detected. In the second chapter of this thesis, a recombinant BoHV-5 in which the genes encoding glycoproteins I, E and protein US9 were deleted (BoHV5 *gI/gE/US9*) was evaluated in its potential to protect cattle against BoHV-5 encephalitis in an inactivated vaccine. Eight calves were subcutaneously vaccinated with 3 ml of the vaccine on days 0 and 28 (vaccinated group; VG). Another four calves were mock vaccinated with the vaccine diluent (control group, CG). After challenge with wild type virus (EVI 88/95), the VG animals showed mild clinical signs of respiratory infection, whereas animals CG developed severe respiratory disease and encephalitis, which led to euthanasia of two of the four CG animals. The inactivated vaccine conferred protection against encephalitis in animals after challenge, but did not prevent viral reactivation. The studies conducted here demonstrate for the first time the occurrence of co-infections with BoHV-1, BoHV-2 and BoHV-5, but not with BoHV-4 and OvHV-2 in TG of cattle. In the second chapter, demonstrated the efficacy of an inactivated vaccine prepared with the recombinant BoHV5 *gI/gE/US9* in the protection of cattle against encephalitis caused by wild-type BoHV-5.

¹Doctoral thesis, Doctor of Veterinary Science, Veterinary Microbiology, Virology, Graduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. (p. 96), September, 2012.

LISTA DE FIGURAS

	Página	
FIGURA 1	Esquema e fotomicrografia de um vírion (microscopia eletrônica) de HHV-1.....	19
FIGURA 2	Estruturas de DNA de herpesvírus.....	21
FIGURA 3	Ciclo replicativo do herpesvírus humano 1.....	25
FIGURA 4	Diagrama de montagem dos herpesvírus	28
FIGURA 5	Animal inoculado experimentalmente com BoHV-5, denotando secreção nasal mucopurulenta	32

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Classificação taxonômica de alguns representantes da ordem <i>Herpesvirales</i>	20

LISTA DE ABREVIATURAS

alfa-TIF: “trans-inducing factor”
AIHV-1: herpesvírus alcelafino 1
AtHV-2: herpesvírus atelino 2
BICP: “bovine infected cell protein”
BoHV-1: herpesvírus bovino 1
BoHV-2: herpesvírus bovino 2
BoHV-4: herpesvírus bovino 4
BoHV-5: herpesvírus bovino 5
BoHV-6: herpesvírus bovino 6
BuHV-1: herpesvírus bubalino 1
CaHV-1: herpesvírus canino 1
CI: controle interno
CpHV-1: herpesvírus caprino 1
CpHV-2: herpesvírus caprino 2
CvHV-1: herpesvírus cervídeo 1
DNA: ácido desoxirribonucleico
ECP: efeito citopático
EHV-1: herpesvírus equino 1
ELISA: ensaio imunoenzimático
EUA: Estados Unidos da América
FCM: febre catarral maligna
gB: glicoproteína B
gC: glicoproteína C
gD: glicoproteína D
gE: glicoproteína E
gH: glicoproteína H
gI: glicoproteína I
gK: glicoproteína K
gL: glicoproteína L
gM: glicoproteína M
HHV-1: herpesvírus humano 1
HHV-2: herpesvírus humano 2
HHV-3: herpesvírus humano 3
HHV-8: herpesvírus humano 8
HiHV-1: herpesvírus hipotragino 1
HVEM: “herpes simplex virus entry mediator”
IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina
IF: imunofluorescência
IFI: imunofluorescência indireta
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa
IPX: imunoperoxidase
LSDV: “lumpy skin disease virus”
LUR: “long and unique region”
McHV-1: herpesvírus macacino 1
McHV-5: herpesvírus macacino 5
MgCl₂: cloreto de magnésio
MuHV-4: herpesvírus murino 4
OIE: organização internacional de epizootias
ORF: “open reading frame”
OvHV-2: herpesvírus ovino 2
PaHV-2: herpesvírus papiino 2
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase

PLSD: “pseudolumpy skin disease”
prDNA: DNA polirepetitivo
PRV: vírus da doença de Aujeszky
pUL15: proteína viral UL15
pUL18: proteína viral UL18
pUL19: proteína viral UL19
pUL25: proteína viral UL25
pUL26.5: proteína viral UL26.5
pUL28: proteína viral UL28
pUL32: proteína viral UL32
pUL33: proteína viral UL33
pUL35: proteína viral UL35
pUL38: proteína viral UL38
qPCR: PCR em tempo real
RS: Rio Grande do Sul
SaHV-1: herpesvírus saimirino 1
SaHV-2: herpesvírus saimirino 2
SN: soroneutralização
SNC: sistema nervoso central
SuHV-1: herpesvírus suíno 1
SuHV-3: herpesvírus suíno 3
Tk: timidina quinase
UL: região única longa
UL3.5: proteína do tegumento
UL11: proteína do tegumento
UL16: proteína do vírion
UL21: proteína do tegumento
UL22: glicoproteína H
UL23: timidina quinase
UL24: proteína associada a membrana
UL27: glicoproteína B
UL28: proteína de empacotamento e clivagem
UL 29: proteína de ligação ao DNA
UL30: DNA polimerase
UL36: proteína do tegumento
UL43: proteína do vírion (membrana)
UL44: glicoproteína C
UL48: fator de indução (tegumento)
US: região única curta
US6: glicoproteína D
US9: proteína do vírion (tegumento)
VHS: “virion host shutoff protein”
VP16: proteína do vírion 16
VP8: proteína do vírion 8
VZV: vírus varicela-zoster

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1 – INTRODUÇÃO	14
1.2 – Objetivos.....	18
1.2.1 – Objetivo geral.....	18
1.2.2 – Objetivos específicos	18
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 – Família <i>Herpesviridae</i>	19
2.2 – Genoma.....	21
2.3 – Espécies hospedeiras.....	22
2.4 – Ciclo replicativo.....	24
2.4.1 – Adsorção	25
2.4.2 – Fusão e penetração	26
2.4.3 – Expressão gênica e replicação do genoma	26
2.4.4 – Morfogênese e liberação	27
2.5 – Latência.....	28
2.6 – Patogenia e enfermidades relacionadas aos herpesvírus de ruminantes	31
2.6.1 – BoHV-1 e BoHV-5	31
2.6.1.1 – Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR).....	31
2.6.1.2 – Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV).....	32
2.6.1.3 – Balanopostite pustular infecciosa (IPB).....	32
2.6.1.4 – Aborto	32
2.6.1.5 – Encefalite	32
2.6.2 – BoHV-2.....	33
2.6.2.1 – Mamilite herpética bovina.....	33
2.6.2.2 – Dermatose nodular atípica.....	34
2.6.3 – BoHV-4.....	34
2.6.4 – OvHV-2.....	34
2.6.4.1 - Febre catarral maligna	34
2.7 – Diagnóstico laboratorial.....	35
2.7.1 – Isolamento viral.....	35
2.7.2 – Diagnóstico sorológico.....	36

2.7.3 – Amplificação de ácidos nucleicos por PCR	37
2.7.3.1 – Controle interno	38
2.7.3.2 – Diagnóstico de infecções latentes	38
2.8 – Vacinação e controle.....	39
2.8.1 – Vacinas contra BoHV-1 e BoHV-5.....	40
2.8.2 – Vacinas contra os demais herpesvírus de ruminantes.....	41
3 – CAPÍTULO 1	42
3.1 - Search for Bovine herpesvirus 2, Bovine herpesvirus 4 and Ovine herpesvirus 2 DNA in trigeminal ganglia of cattle	42
4 – CAPÍTULO 2	67
4.1 - Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine	67
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
BIBLIOGRAFIA	77

1 – INTRODUÇÃO

Os membros da família *Herpesviridae* são vírus envelopados que possuem uma molécula de DNA fita dupla como genoma. Os vírus desta família têm co-evoluído com seus hospedeiros por milhões de anos, sendo a maioria usualmente associada a uma única espécie hospedeira, embora ocasionalmente possam infectar hospedeiros distintos (ROIZMAN E PELLETT, 2001; DAVISON, 2002). Como exemplo, vários herpesvírus têm sido identificados em bovinos, tais como o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2), herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4), herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e o herpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2). Esses vírus compartilham propriedades moleculares e antigênicas e estão relacionados a diferentes infecções clínicas em bovinos (THIRY et al., 2006). Normalmente, em função do longo tempo de co-evolução, os herpesvírus tendem a causar poucas doenças ou afecções de baixa gravidade em seus hospedeiros naturais. Entretanto, quando ocasionalmente afetam outras espécies que não seus hospedeiros naturais, as consequências são geralmente graves (DAVISON, 2002).

Taxonomicamente, a ordem *Herpesvirales* inclui 3 famílias, 3 subfamílias, 14 gêneros e 136 espécies (DAVISON et al., 2009). A família *Herpesviridae*, onde são classificados os herpesvírus de mamíferos e aves, é dividida em três subfamílias, chamadas de *Alfa-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*. Os BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 são classificados no gênero *Varicellovirus* dentro da subfamília *Alphaherpesvirinae*. Já a subfamília *Gammaherpesvirinae*, possui membros como o BoHV-4 e o OvHV-2 (DAVISON et al., 2009). Os herpesvírus caracterizam-se pela capacidade de induzir infecções latentes. Os alfaherpesvírus são capazes de induzir infecções latentes em neurônios, ao passo que os beta e gama herpesvírus induzem latência em células do sistema linfóide (ROIZMAN & PELLETT, 2001).

Entre os alfa herpesvírus que infectam ruminantes, o vírus protótipo é o BoHV-1 (gênero *Varicellovirus*), um patógeno de bovinos associado a uma série de quadros clínicos, incluindo a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) a balanopostite pustular infecciosa (IPB) e outras patologias, tais como encefalites, conjuntivites e falhas reprodutivas (PASTORET et al., 1982). As infecções por BoHV-1 tem despertado uma grande preocupação econômica em várias partes do mundo, especialmente na Europa, onde a IBR está em processo de erradicação (ou erradicada) em vários países (THIRY et al., 1999). No Brasil este vírus está disseminado, com um grande

número de propriedades contendo rebanhos soropositivos (ROEHE et al., 1997a), e não existe nenhum programa de controle implementado.

O BoHV-2 pertence ao gênero *Simplexvirus* e tem sido associado com duas formas clínicas distintas e bem definidas em bovinos: lesões localizadas nos tetos ou ocasionalmente disseminadas pelo úbere (mamilitite herpética) e lesões generalizadas na pele (dermatose nodular atípica) (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977). As lesões de mamilitite podem ser confundidas com outras infecções de pele de bovinos, incluindo aquelas causadas pelo vírus da pseudocowpox e pelo vírus *Vaccinia* (JACKSON, 1993; LOBATO et al., 2005). O BoHV-2 foi isolado pela primeira vez em 1957 na África do Sul, de bovinos que apresentavam lesões generalizadas na pele (ALEXANDER et al., 1957) e posteriormente em Ruanda Urundi, a partir de lesões nos tetos de vacas leiteiras (HUYGELEN et al., 1960). No entanto, a importância do BoHV-2 como agente de mamilitite só foi destacada em 1964, após o isolamento do vírus de uma doença ulcerativa de tetos e úbere de vacas leiteiras (MARTIN et al., 1966). A infecção pelo BoHV-2 tem sido detectada por isolamento/sorologia em vários países, incluindo o Kênia (MARTIN & GWYNNE, 1968), Austrália (TURNER et al., 1974), Reino Unido (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977), EUA (LETCHEWORTH & LADUE, 1982), Itália (CASTRUCCI et al., 1982), Brasil (ALICE, 1977) e Japão (IMAI et al., 2005).

O BoHV-4, diferentemente dos vírus anteriores, é um membro da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus*. Foi isolado pela primeira vez em bovinos jovens com infecção respiratória e ceratoconjuntivite na Hungria (BARTHA et al., 1966). Desde então, tem sido detectado em bovinos apresentando sinais clínicos variados, como: conjuntivite, metrite, pneumonias, enterites, mastite, lesões de pele e tumores no rúmen e na bexiga (GOYAL & NAEEM, 1992; EGYED et al., 1996), mas também de bovinos aparentemente saudáveis (BELAK & PALFI, 1974). Apesar do envolvimento do vírus com diferentes enfermidades em bovinos, um número crescente de estudos vem demonstrando que o vírus está relacionado a enfermidades reprodutivas (DEIM et al., 2007; DONOFRIO et al., 2007). O BoHV-4 apresenta distribuição mundial e já foi detectado em vários países, como Suíça (METZLER & WYLER, 1986), Bélgica (VAN MALDEREN et al., 1987), Holanda (WELLENBERG et al., 1999), Alemanha (TRUMAND et al., 1986), Espanha (MONGE et al., 2006), Japão (IZUMI et al., 2006), Turquia (BILGE-DAGALP et al., 2007), Itália (DONOFRIO et al., 2009), Argentina (PEREZ et al., 2011) e no Brasil (KRÜGER, 2012).

O BoHV-5, pertencente ao gênero *Varicellovirus*, é o agente etiológico da meningoencefalite viral bovina ou encefalite herpética bovina, uma enfermidade que acomete principalmente bovinos jovens e na sua forma aguda é geralmente fatal (ROIZMAN et al., 1992). O BoHV-5 tem sua história natural ainda pouco conhecida, em função da similaridade antigênica e molecular com BoHV-1 (ROEHE et al., 1997a). Entretanto, com base em estudos capazes de diferenciar estes dois vírus, foi demonstrado que o BoHV-5 pode ser encontrado em fetos abortados, sêmen e gânglios trigêmeos de bovinos (ESTEVES et al., 2003; GOMES et al., 2003; AFONSO et al., 2007; CAMPOS et al., 2009; KIRKLAND et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Nos EUA, casos isolados de meningoencefalites por BoHV-5 já foram documentados (D'OFFAY et al., 1993; ELY et al., 1996; ASHBAUGH et al., 1997). Entretanto, por razões ainda desconhecidas, a distribuição do BoHV-5 esta restrita a países do Hemisfério Sul. Um dos primeiros isolados de BoHV-5 é australiano (FRENCH, 1962; SMITH et al., 1995) e surtos de meningoencefalite têm sido detectados no Brasil, Argentina e Uruguai (SCHUDEL et al., 1986; SALVADOR et al., 1998; PIDONE et al., 1999; SILVA, et al., 2007a).

O OvHV-2 pertence ao gênero *Macavirus* e é o agente causador da febre catarral maligna (FCM) associada aos ovinos, uma grave síndrome linfoproliferativa que ocasionalmente afeta bovinos. A enfermidade já foi diagnosticada na Europa, Oriente Médio, África e América do Sul (RUSSELL et al., 2009). O vírus é transmitido principalmente pela via respiratória e pode ser eliminado de forma intermitente em secreções nasais (LI et al., 2004; OIE, 2008). Embora a doença geralmente seja fatal em bovinos, búfalos, veados e outros não-ruminantes, como suínos (LOKEN et al., 1998; ACKERMANN, 2006; LI et al., 2006), o vírus persiste subcl clinicamente em ovinos, o seu reservatório natural, e um número elevado de ruminantes podem sobreviver a infecções por OvHV-2 com ou sem sinais clínicos de FCM (VIKOREN et al., 2006). O OvHV-2 é o principal causador da FCM em bovinos no Brasil, principalmente quando ocorre criação concomitante com ovinos (RIET-CORREA et al., 1998). Um detalhe importante é que esse vírus nunca foi isolado em cultivo celular (STORZ et al., 1976; PLOWRIGHT, 1990).

O Brasil possui atualmente o maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 213 milhões de bovinos e 75% dessa produção é consumida internamente no país (MAPA, 2011). O controle de doenças contribui para o aumento da produção e auxilia nas exportações. Em 2008, por exemplo, aproximadamente 59% do território nacional foram considerados pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), livres da febre aftosa. Além disso, os estados da Região Sul possuem a menor prevalência

de brucelose e tuberculose animal do país (MAPA, 2011). Nessa mesma linha, se torna essencial expandir o conhecimento sobre a biologia dos herpesvírus que podem afetar bovinos e outros ruminantes.

Em dados recentes, um estudo identificou a presença de DNA viral em gânglios trigêmeos, de animais aparentemente saudáveis, coletados em frigorífico. Em uma amostragem de 200 animais, 87% estavam latentemente infectados. Dentre estes, a prevalência de infecções somente por BoHV-5 (93,1%) foi maior que a de infecções somente por BoHV-1 (75,9%). Além disso, 66% dos animais estavam coinfectados com ambos os tipos de vírus (CAMPOS et al., 2009). Então, o objetivo da primeira etapa desta tese foi investigar a presença de outros herpesvírus que afetam ruminantes. Como por exemplo, o BoHV-2 que pode estabelecer infecções latentes em gânglios sensoriais (LETCHWORTH & CARMICHAEL, 1982; TORRES et al., 2009a) e BoHV-4 e OvHV-2, que apesar de estarem associados a diferentes condições clínicas, ambos os vírus têm sido encontrados em secreções nasais de bovinos (DUBUISSON et al., 1989, HUSSY et al., 2002, LI et al., 2004).

A vacinação é uma das formas de minimizar os danos causados pela infecção de herpesvírus (KAASHOEK et al., 1995). Vacinas recombinantes estão sendo desenvolvidas através da deleção de genes não essenciais e licenciadas para uso a campo (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Estas deleções visam tornar a amostra vacinal apatogênica e reter sua capacidade imunogênica (BELKNAP et al., 1994; FRANCO et al., 2002). Além disso, a remoção de genes não essenciais permite, em conjunto com testes diagnósticos específicos, a distinção entre animais vacinados e naturalmente infectados (VAN OIRSCHOT et al., 1996a; MARS et al., 2001). No Brasil, existem poucas vacinas específicas contra infecções pelo BoHV-5, pelo que os produtores têm poucas alternativas para o controle dessa infecção e acabam imunizando seus animais contra BoHV-1 (SINDAM, 2012). Neste sentido, dentro de uma linha de pesquisa que visa o desenvolvimento de recombinantes com potencial uso vacinal, Franco e colaboradores (2007) construíram um BoHV-5 recombinante, do qual foram deletados os genes *gI*, *gE* e *US9*, denominado BoHV-5 *gI/gE/US9*. Este recombinante mostrou-se significativamente menos patogênico que o vírus selvagem parental, quando utilizado como vacina atenuada, mas ainda apresentou patogenicidade residual (HÜBNER et al., 2005). Não obstante, esse recombinante foi considerado interessante para ser utilizado na forma inativada, pois desta forma, mantém sua característica marcadora e pode proteger os animais vacinados. Uma vacina inativada pode ter eficácia comparável a de uma vacina similar contendo o agente

atenuado, com a vantagem de ser mais segura (KAASHOEK et al., 1995) no sentido que que não ocorre risco de reversão à virulência. Então no segundo capítulo desta tese foi realizada a avaliação do vírus recombinante BoHV-5 *gI/gE/US9* como antígeno vacinal em uma preparação inativada.

1.2 - Objetivos

1.2.1 - Objetivo geral

Os objetivos gerais do presente trabalho foram:

- a) Contribuir para o conhecimento da biologia dos herpesvírus (BoHV-1, BoHV-2, BoHV-4, BoHV-5 e OvHV-2) em bovinos e suas possíveis interações com os hospedeiros;
- b) Contribuir para o desenvolvimento de medidas mais eficazes para o controle de infecções por BoHV-5.

1.2.2 - Objetivos específicos

- a) Padronizar métodos de detecção molecular do DNA de BoHV-2, BoHV-4 e OvHV-2 e pesquisar a presença destes vírus em gânglios trigêmeos de bovinos;
- b) Avaliar o potencial de BoHV-5 recombinante como amostra vacinal inativada frente ao desafio com BoHV-5 selvagem.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Família *Herpesviridae*

Os membros da família *Herpesviridae* pertencentes à ordem *Herpesvirales* são vírus que apresentam um admirável sucesso evolutivo. O nome, derivado do grego “ερπειν” (herpein) = "serpentear", refere-se à característica das lesões provocadas por herpesvírus humanos: vesículas causadas pelo herpesvírus humano tipos 1 (HHV-1), 2 (HHV-2) e 3 (HHV-3), atribuídas aos animais rastejadores na antiguidade. Esta família abriga mais de 130 vírus de hospedeiros tão diversos como aves e mamíferos (ROIZMAN & PELLETT, 2001; DAVISON et al., 2009). Na natureza, a maioria dos herpesvírus está usualmente associada a uma determinada espécie hospedeira, sendo que quase todos os animais investigados até o momento apresentam infecções por pelo menos uma espécie de herpesvírus (DAVISON, 2002).

Os herpesvírus caracterizam-se morfologicamente por apresentarem o genoma de DNA contido em um capsídeo icosaédrico formando o nucleocapsídeo. Esta estrutura é envolta por uma matriz proteica denominada tegumento e por um envelope composto de uma bicamada lipídica entremeada por proteínas virais conforme ilustrado na Fig. 1 (PELLETT & ROIZMAN, 2006).

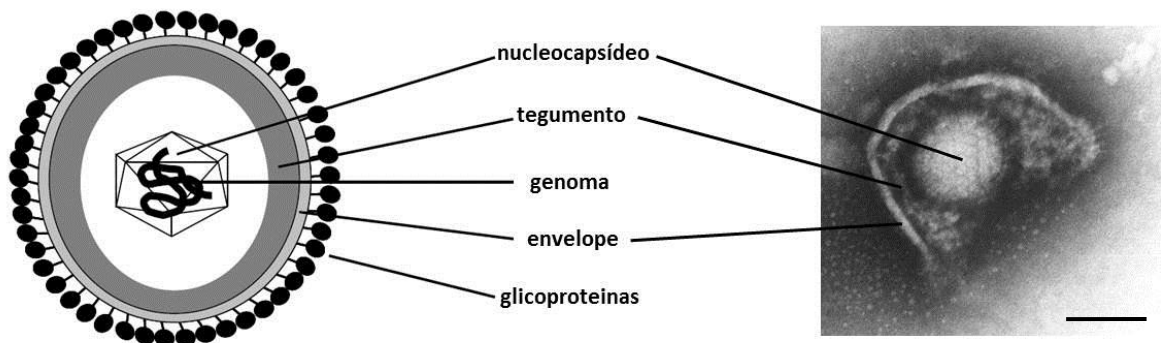


Figura 1 - Esquema e fotomicrografia de um vírion (microscopia eletrônica) de herpesvírus humano 1, (protótipo da família *Herpesviridae*). As linhas indicam os principais componentes do vírion (nucleocapsídeo, tegumento, genoma, envelope e glicoproteínas). Fonte: ICTVdB, 2006.

Taxonomicamente, a família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias de acordo com aspectos biológicos e moleculares em comum: *Alfa-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*. A subfamília *Alphaherpesvirinae* abriga importantes patógenos de humanos e de animais, incluindo os herpesvírus humano (HHV-1, HHV-2 e HHV-3),

bovino (BoHV-1 e BoHV-5), o vírus da doença de Aujeszky (PRV), o herpesvírus caprino 1 (CpHV-1), entre outros (Tabela 1). Os membros dessa subfamília caracterizam-se por apresentarem um ciclo replicativo curto e disseminação rápida em células de cultivo, por possuírem um amplo espectro de hospedeiros e pela capacidade de estabelecerem infecções latentes em gânglios sensoriais e autonômicos (ROIZMAN et al., 1992).

A subfamília *Gammaherpesvirinae* também abriga importantes patógenos humanos (HHV-4; HHV-8) e de animais, como o herpesvírus alcelafino tipo 1 (AIHV-1) e OvHV-2, que infectam, respectivamente gnus e ovinos, e são responsáveis pela FCM em bovinos (ROIZMAN & PELLETT, 2001) (Tabela 1). Os vírus que pertencem a essa subfamília possuem uma gama restrita de hospedeiros (exceto o BoHV-4) e caracterizam-se por sua replicação em linfócitos T e B, pelo estabelecimento de infecções latentes em tecidos linfóides e por causar doenças linfoproliferativas, neoplasias e morte celular (MURPHY et al., 1999). O agente da FCM foi inicialmente denominado herpesvírus bovino tipo 3 até sua caracterização molecular (ROSSITER et al., 1988).

Tabela 1 – Classificação taxonômica de alguns representantes da ordem *Herpesvirales**.

Família	Subfamília	Gênero	Espécie	Acrônimo	
<i>Herpesviridae</i>	<i>Simplexvirus</i>		<i>Herpesvírus bovino 2</i>	BoHV2	
			<i>Herpesvírus humano 1</i>	HHV1	
			<i>Herpesvírus humano 2</i>	HHV2	
			<i>Herpesvírus macacino 1</i>	McHV1	
			<i>Herpesvírus papiino 2</i>	PaHV2	
			<i>Herpesvírus saimirino 1</i>	SaHV1	
		<i>Alphaherpesvirinae</i>		<i>Herpesvírus bovino 1</i>	BoHV1
				<i>Herpesvírus bovino 5</i>	BoHV5
				<i>Herpesvírus bubalino 1</i>	BuHV1
				<i>Herpesvírus canino 1</i>	CaHV1
	<i>Varicellovirus</i>			<i>Herpesvírus caprino 1</i>	CpHV1
				<i>Herpesvírus cervídeo 1</i>	CvHV1
			<i>Herpesvírus equino 1</i>	EHV1	
			<i>Herpesvírus humano 3</i>	HHV3	
		<i>Herpesvírus suíno 1</i>	SuHV1		
	<i>Rhadinovirus</i>		<i>Herpesvírus atelino 2</i>	AtHV2	
			<i>Herpesvírus bovino 4</i>	BoHV4	
			<i>Herpesvírus humano 8</i>	HHV8	
			<i>Herpesvírus macacino 5</i>	McHV5	
			<i>Herpesvírus murino 4</i>	MuHV4	
		<i>Herpesvírus saimirino 2</i>	SaHV2		
<i>Gammaherpesvirinae</i>			<i>Herpesvírus alcelafino 1</i>	AIHV1	
			<i>Herpesvírus bovino 6</i>	BoHV6	
		<i>Macavirus</i>		<i>Herpesvírus caprino 2</i>	CpHV2
				<i>Herpesvírus hippotragino 1</i>	HiHV1
			<i>Herpesvírus ovino 2</i>	OvHV2	
	<i>Herpesvírus suíno 3</i>	SuHV3			

*Adaptado de Davison (2009). Em destaque os vírus abordados neste estudo.

2.2 – Genoma

O genoma dos vírus desta família é composto de uma molécula de DNA dupla fita e o seu arranjo é dividido em seis classes diferentes (ROIZMAN et al., 1992) (Figura 2).

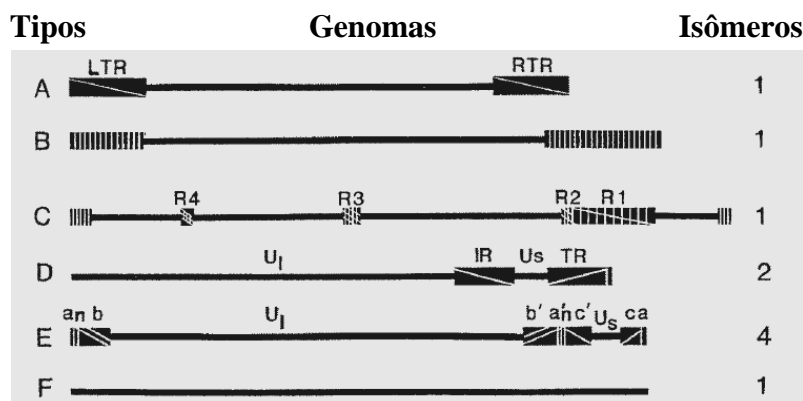


Figura 2 – Estruturas de DNA de Herpesvírus. As linhas representam sequências únicas e os blocos representam sequências repetidas. Os isômeros são os diferentes formatos que o genoma pode apresentar conforme a orientação das sequências únicas e das sequências repetidas (adaptado de ROIZMAN et al., 1992).

Os alfa herpesvírus do gênero *Varicellovirus*, como o BoHV-1 e o BoHV-5, apresentam o tipo “D” de organização genômica, sendo composto de duas sequências únicas: uma única longa ou “long” (UL) e uma única curta ou “short” (US), sendo esta última flanqueada por sequências terminais repetidas inseridas de forma invertida no genoma: a região repetida interna (IR) e a região repetida terminal (TR) (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). O genoma de BoHV-1 e BoHV-5 é linear e possui respectivamente, 135.301 e 137.821 pares de bases (pb) (DELHON, et al., 2003; GENBANK, 2012).

O BoHV-2 possui o tipo “E” de organização genômica, sendo semelhante aos quatro isômeros do genoma presentes em herpesvírus humano (ROIZMAN et al., 1992). As sequências dos genes de BoHV-2, tais como, *UL23* (timidina quinase), *UL27* (glicoproteína B), *UL28* e *UL 29* (“infected cell protein” – ICP 18.5 e 8) foram determinados e compartilham um maior grau de identidade com os HHV- 1 e HHV-2 do que com os outros herpesvírus bovino. Esta relação é tão próxima para a *UL27*, que tem permitido especular que BoHV-2 divergiu durante a evolução dos herpesvírus de primatas (MCGEOCH & COOK, 1994).

O BoHV-4 possui o genoma com estrutura tipo “B” (ROIZMAN & PELLET, 2001) de 108.873 pb (GENBANK, 2012). Esta molécula de ácido nucleico é constituída de uma sequência central denominada long and unique region (LUR). Em ambas as extremidades, existem em número variável o chamado DNA poli-repetitivo (prDNA):

unidades monoméricas de classe I, II e III que, ao todo, somam 15 segmentos. A região prDNA é entendida como não codificadora (EHLERS et al., 1985; BROLL et al., 1999).

O OvHV-2 apresenta o genoma circular com 135.135 pb e possui o tipo “B” de organização genômica (HART et al., 2007). Através da análise computacional foram identificadas 73 fases abertas de leituras ou do inglês “open reading frames” (ORFs) no seu genoma. Foi proposto, com base no parentesco evolutivo de sequências conservadas de ORF, que os gamaherpesvírus associados FCM possuem o seu próprio gênero, o *Macavirus* (MCGEOCH et al., 2006). Este novo agrupamento foi confirmado pelo sequenciamento do genoma, mostrando que OvHV-2 é muito semelhante ao AIHV-1 e SuHV-3 (HART et al., 2007).

2.3 – Espécies hospedeiras

Uma característica dos alfaherpesvírus, que pode ter importantes implicações epidemiológicas, é o seu amplo espectro de hospedeiros susceptíveis (ROIZMAN et al., 1992). Existem várias evidências da capacidade desses vírus de cruzar a barreira interespecies e infectar espécies relacionadas. A infecção natural pelo BoHV-1 já foi relatada em caprinos com sinais neurológicos, e posteriormente o vírus foi reativado pela administração de dexametasona em animais do mesmo rebanho (TOLARI et al., 1990). Anticorpos contra o BoHV-1 também já foram detectados em caprinos no Brasil (ALEXANDRINO et al., 2010) e na Turquia (YESILBAG et al., 2003). Além disso, evidências sorológicas da infecção pelo BoHV-1 em ruminantes selvagens foram relatadas na França e na Bélgica (THIRY et al., 1988), nos EUA (FULTON et al., 1982; AGUIRRE et al., 1995), no Brasil (LAGE et al., 1996), e no Canadá (JORDAN et al., 2003).

Além das evidências de infecção natural, infecções experimentais de espécies heterólogas com os alfaherpesvírus também têm sido realizadas com sucesso. A inoculação de caprinos com o BoHV-1 resultou no desenvolvimento de sinais respiratórios brandos e soroconversão, com a subsequente reativação da infecção latente após a administração de dexametasona. Além disso, bovinos inoculados com o CpHV-1 também excretaram o vírus em secreções nasais e soroconverteram (SIX et al., 2001). Infecções experimentais realizadas com o BoHV-1 em ovinos também demonstraram a susceptibilidade desta espécie ao agente (HAGE et al., 1997). O BoHV-5 demonstrou ser capaz de produzir enfermidade neurológica em ovinos (BELÁK et al., 1999; SILVA et al., 1999), bem como de reativar a infecção latente após a administração de dexametasona (SILVA et al., 1999).

O BoHV-1 e o BoHV-5 são estreitamente relacionados com outros herpesvírus de ruminantes, incluindo o CpHV-1, o herpesvírus bubalino 1 (BuHV-1) e os herpesvírus cervídeo tipos 1 e 2 (CvHV-1 e 2) (THIRY et al., 2006). A reatividade sorológica cruzada, associada com a possibilidade dos alfa herpesvírus se disseminarem entre as populações de ruminantes constituem-se em ameaças potenciais aos programas de controle e erradicação do BoHV-1 (THIRY et al., 2006). Espécies que potencialmente possam ser infectadas pelo BoHV-1 podem servir de reservatórios para o vírus e contribuir para a sua manutenção na natureza (SIX et al., 2001). Entretanto, a importância epidemiológica de outra espécie, que não a bovina, na manutenção do BoHV-1 e BoHV-5 na natureza permanece controversa (ENGELS et al., 1992; HAGE et al., 1997; ACKERMANN & ENGELS, 2006; THIRY et al., 2006) e vem sendo alvo de vários estudos (HAGE et al., 1997; BELÁK et al., 1999; SIX et al., 2001).

Anticorpos contra o BoHV-2 têm sido detectados no rebanho bovino de vários países (DARDIRI & STONE, 1972; ALICE, 1977; MARTIN & GWYNNE, 1968; CASTRO et al., 1988; IMAI et al., 2005) e em várias espécies de animais silvestres, mesmo na ausência de sinais clínicos da infecção, sugerindo que as infecções são frequentemente subclínicas (MARTIN & GWYNNE, 1968). A infecção já foi reproduzida experimentalmente em camundongos, coelhos, cobaias (PEPPER et al., 1966; SMEE & LEONHARD, 1994), ovinos e caprinos (WESTBURY, 1981). Ovinos inoculados com o vírus podem desenvolver lesões semelhantes às observadas em bovinos (ALMEIDA et al., 2008). A capacidade do BoHV-2 estabelecer infecções latentes em bovinos foi confirmada por Martin & Scott (1979). A biologia da infecção latente, no entanto, ainda não foi satisfatoriamente esclarecida, com resultados inconsistentes de reativação experimental da infecção (WESTBURY, 1981; ALMEIDA et al., 2008).

A replicação da maioria dos gama herpesvírus é restrita a espécies que são naturalmente hospedeiras. O BoHV-4 é uma das poucas exceções à regra. Ao contrário dos demais, o BoHV-4 tem se mostrado capaz de se multiplicar em ampla diversidade de espécies tanto *in vivo* como *in vitro*. Além de bovinos europeus, o BoHV-4 tem sido isolado de espécies de ruminantes, tais como zebu (*Bos indicus*), bisão americano (*Bison bison*), búfalo africano (*Sincerus caffer*) e ovinos (*Ovis aries*). Isolamentos esporádicos foram relatados em leões (*Panthera leo*), gatos (*Felis catus*), macacos (*Aotus trivirgatus*). Experimentalmente, foi comprovado que BoHV-4 pode infectar cabras, porcos da Índia e coelhos. Quando *in vitro*, o BoHV-4 é capaz de se replicar em diferentes células de cultivo

primário ou de linhagens de diversas espécies animais (EGYED, 1998; GILLET et al., 2004).

Ovinos são considerados os reservatórios de OvHV-2 na FCM associada ao ovino (PLOWRIGHT, 1990). A FCM associada ao gnu é induzida pelo herpesvírus alcelafino 1 (AIHV-1) (PLOWRIGHT, 1990; MURPHY et al., 1999). Como os gnus, teoricamente ovelhas adultas sob condições naturais de rebanho podem estar infectadas (LI, H. et al., 1994, 1995). De maneira semelhante ao que ocorre com AIHV-1 em relação aos gnus, a transmissão de OvHV-2 aos bovinos e outros ruminantes é associada ao período perinatal dos ovinos; cordeiros seriam uma importante fonte de transmissão do vírus (BAXTER et al., 1997). Entretanto, existem estudos indicando que cordeiros recém-nascidos não são infectados e, portanto, não são fontes importantes para a transmissão de OvHV-2 (LI et al., 2000, 2004). O grupo de vírus da FCM são espécie-específicos e a maioria das espécies de ruminantes, domésticos ou selvagens, são bem adaptadas a eles, isto é, esses vírus induzem pouco ou nenhum efeito em seus hospedeiros naturais, mas podem causar doença quando afetam espécies diferentes pouco adaptadas. (ROIZMAN et al., 1981; BRIDGEN & REID, 1991).

2.4 – Ciclo replicativo

Os herpesvírus são transmissíveis de hospedeiros imunes como partículas virais livres e precisam evitar a neutralização pelos anticorpos do hospedeiro (GRECO et al., 2000). Eles replicam o seu genoma no núcleo da célula hospedeira utilizando fatores virais e celulares (Figura 3). Neste processo, para a replicação do HHV-1 (protótipo da família), algumas glicoproteínas são consideradas essenciais (gB, gD, gH, gL e gK). Outras glicoproteínas (gC, gE, gI, gM), embora desempenhem funções importantes, são consideradas não essenciais, pois sua remoção não leva a um bloqueio total da replicação viral (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

As glicoproteínas atuam em inúmeras etapas do ciclo de replicação viral (reconhecimento e ligação aos receptores celulares; fusão das membranas viral e celular; penetração do material viral no citoplasma; maturação e saída das partículas virais da célula e na evasão da resposta imune). Em face da sua localização no envelope e na superfície das células infectadas, são importantes alvos para o sistema imune do hospedeiro (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; HANON et al., 1999; WINKLER et al., 1999; LIMAN et al., 2000; KOPPERS-LALIC et al., 2001).

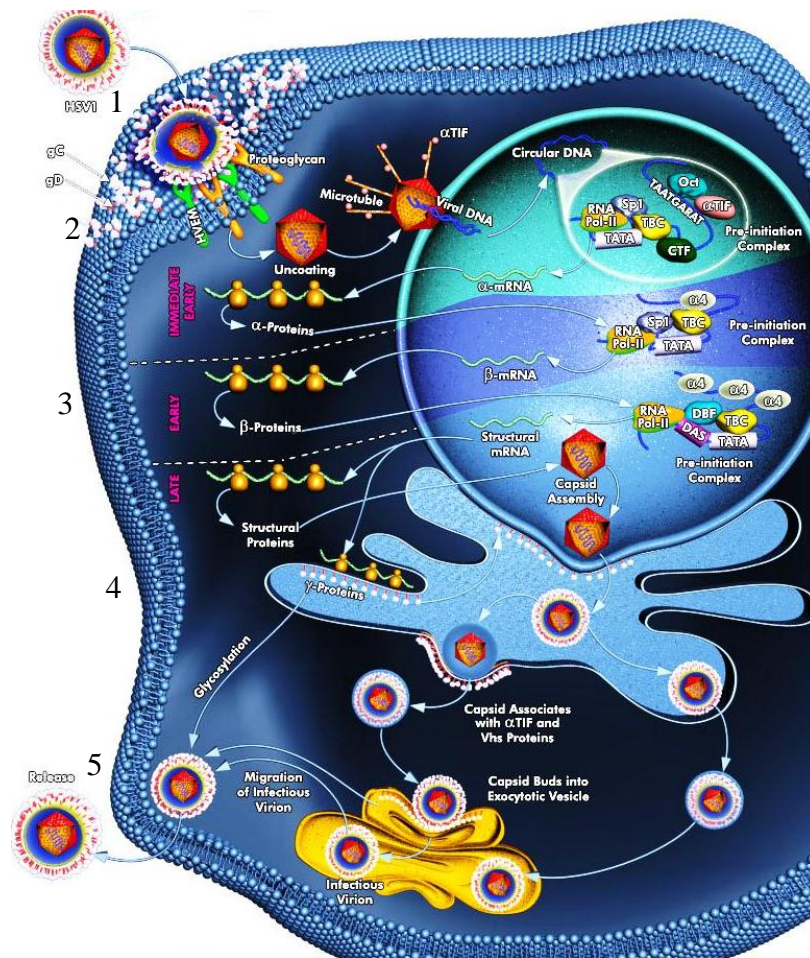


Figura 3 – Ciclo replicativo do herpesvírus humano 1. As principais fases do ciclo replicativo são ilustradas acima: (1) Adsorção e penetração. (2) Desnudamento e liberação do genoma no interior do núcleo. (3) Transcrição dos genes alfa, beta e gama. (4) Morfogênese seguida do empacotamento. (5) Transporte dos vírions em vesículas até a liberação na superfície celular. Fonte: QIAGEN: <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=228>.

A infecção de células permissivas resulta na expressão do conjunto completo de genes virais e na produção de progênie viral infecciosa. Entretanto, este processo é incompatível com a sobrevivência das células e resulta inevitavelmente em lise, sendo denominado ciclo lítico (ROIZMAN & KNIPE, 2001). Este ciclo é dividido didaticamente em etapas descritas brevemente a seguir.

2.4.1 – Adsorção

O primeiro estágio de qualquer infecção viral é a adsorção. Neste processo, as glicoproteínas virais são reconhecidas por receptores específicos na membrana celular. A primeira interação envolve uma ligação de baixa afinidade entre a gB e/ou gC a receptores celulares como o “proteoglican heparan sulfato” e o mediador de entrada do herpesvírus humano 1 (HVEM, sigla para “herpes simplex virus entry mediator”) (HARROP et al.,

1998). Esta é seguida por uma interação de alta afinidade entre a gD e a nectina 1 (membro da superfamília das imunoglobulinas), com subsequente penetração viral por fusão do envelope com a membrana celular (LI, Y. et al., 1995; GERAGHTY et al., 1998; MEYER et al., 1999).

2.4.2 – Fusão e penetração

O processo de fusão do envelope viral com a membrana celular requer pelo menos o envolvimento de quatro glicoproteínas: gD, gB e um heterodímero formado pela gH e gL (LIANG et al., 1995; MEYER et al., 1998; GERDTS et al., 2000). A gD exerce um papel central neste processo, auxiliando nos passos iniciais da adsorção viral através da ligação a receptores celulares e ativando outras proteínas virais que promovem a fusão das membranas (LIANG et al., 1995;). A gB é essencial para fusão entre o envelope viral e membrana celular e atua na disseminação viral célula-a-célula (GERDTS et al., 2000). A gH também está envolvida na fusão das membranas celular e viral e atua na disseminação viral célula-a-célula, além de formar um complexo com a gL (MEYER et al., 1998). Após a fusão do envelope viral com a membrana plasmática ocorre a penetração do nucleocapsídeo e tegumento no citoplasma das células infectadas. No citoplasma ocorre o desnudamento e o genoma viral é transportado até o núcleo para replicação.

2.4.3 – Expressão gênica e replicação do genoma

No primeiro contato com o ambiente intracelular, algumas proteínas presentes no tegumento do vírion têm um papel importante: a proteína do vírion 8 (VP8) atua como um sinal de localização nuclear para BoHV-1; a “virion host shutoff protein” (proteína VHS) tem a função de bloquear a síntese de inúmeras proteínas celulares atuando na desmontagem dos polissomas. Já a proteína do vírion 16 (VP16) ou trans-inducing factor (alfa-TIF) é responsável pela ativação da expressão dos genes alfa (MISRA et al., 1995; HINKLEY et al., 2000; ZHENG et al., 2004).

A transcrição dos genes virais é regulada temporalmente durante a infecção. Ocorre na forma de cascata e inclui a expressão cinética de três classes de genes: “immediate early” ou alfa, correspondentes as proteínas que regulam a replicação viral; os genes “early” ou beta correspondentes as proteínas que sintetizam e empacotam o DNA viral e os genes “late” ou gama correspondentes as proteínas envolvidas na morfogênese de novos vírions (WIRTH et al., 1989; WHITLEY & ROIZMAN, 2001).

Dentre as proteínas codificadas pelos genes alfa, cinco proteínas denominadas “bovine infected cell protein” (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27 e BICP47) ativam a expressão dos genes beta, dando sequência à replicação do DNA 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 disto, 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).

Nos gamaherpesvírus, durante a infecção lítica, três proteínas estão envolvidas na transativação. Estas são transcritas de genes alfa que codificam proteínas imediatamente precoces e iniciam o ciclo de replicação lítica. Duas destas proteínas são codificadas por sequências (ORF) conservadas (ORF50 ou Rta/IE2, ORF57 ou Mta/IE-1), a terceira é por um gene não conservado, que no BoHV-4 chama-se Bo4/5. A ativação do promotor por estas proteínas tem efeito decisivo na síntese de DNA a partir da origem lítica (ori lyt) da replicação, como resultado vírions são produzidos e liberados da célula infectada (ACKERMAN, 2006).

2.4.4 – Morfogênese e liberação

O processo de montagem das partículas víricas é denominado morfogênese. A montagem dos capsídeos acontece no núcleo das células infectadas através da interação de determinadas proteínas virais (pUL18; pUL19; pUL35 e pUL38). Os capsídeos são preenchidos com as moléculas do DNA viral através do auxílio de várias proteínas virais (pUL33; pUL32; pUL28; pUL25; pUL15; pUL 26.5) (ROIZMAN & KNIPE, 2001; METTENLEITER, 2002; METTENLEITER et al., 2006).

Após a montagem das partículas virais no núcleo da célula hospedeira, o nucleocapsídeo viral é envelopado, através da fusão com a membrana nuclear interna, porém para que as partículas virais possam ser liberadas do núcleo, ocorre a fusão do envelope com a membrana nuclear externa, havendo uma acumulação de capsídeos sem envelope no citoplasma. Os capsídeos são então re-envelopados por membranas do complexo de Golgi e transportados em vesículas para o meio extracelular. Partículas defectivas (sem o capsídeo) também são formadas, como representado na Figura 4 (METTENLEITER, 2002; MELANCON et al., 2004; METTENLEITER et al., 2006).

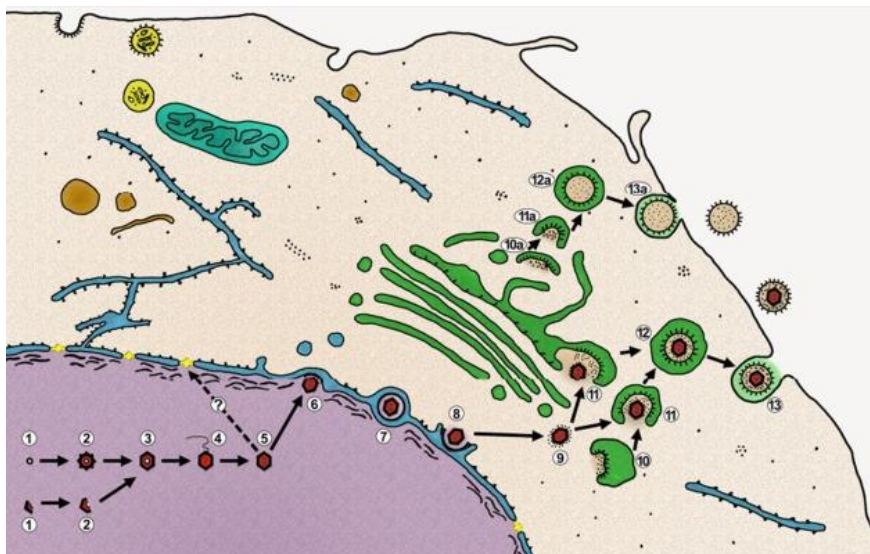


Figura 4 - Diagrama de montagem dos herpesvírus. Nos capsídeos pré-formados por um esqueleto de proteínas intranucleares aglomeradas entre si (1-3) o DNA é empacotado (4). Em seguida, capsídeos contendo DNA (5) mantêm contato com a membrana nuclear interna (6), ocorrendo uma brotação que resulta na formação do envelope primário dos vírions na fenda perinuclear (7). Este envelope se funde com a membrana nuclear externa (8), levando a translocação do nucleocapsídeo para o citosol. No citoplasma, o nucleocapsídeo envolvido pelas proteínas internas do tegumento (9) é transportado até o envoltório final (10), onde glicoproteínas e proteínas externas do tegumento se aglomeram. Neste momento ocorre a formação do envelope secundário do vírion (11) que é transportado em uma vesícula (12) até a liberação na membrana plasmática (13). Paralelamente também ocorre a formação e liberação de partículas defectivas sem capsídeo (10a-13a) (METTENLEITER et al., 2006).

2.5 – Latência

A infecção latente é uma importante estratégia de perpetuação dos herpesvírus nos seus hospedeiros e provavelmente ocorre em todos os animais que desenvolvem uma primo-infecção. Nos alfa herpesvírus, os vírions invadem os neurônios que inervam o sítio de replicação primária na mucosa infectada e são transportados via fluxo axonal retrógrado para o núcleo dos gânglios neuronais associados (gânglios trigêmeos ou para-vertebrais), onde estabelecem a infecção latente (ENQUIST et al., 2002). Os gama herpesvírus tendem a favorecer o estabelecimento de latência a partir da infecção primária, com pouca lise celular. A presença do DNA viral tem sido encontrada em diferentes tecidos de animais natural ou experimentalmente infectados, mas a tendência face ao conhecimento acumulado é de que as células alvo para a latência sejam da linhagem monocítica (ACKERMAN, 2006).

Durante a infecção latente, no qual o genoma viral é funcionalmente conservado dentro do núcleo neuronal sem a produção de vírus infeccioso, o seu DNA permanece de forma episomal, fortemente associado com proteínas celulares e em um número de cópias variável (DECMAN et al., 2005). Há um nível de replicação viral no gânglio ainda durante

a infecção primária que, juntamente com a frequência de reativações, determinam o número de cópias do genoma presente no gânglio latentemente infectado (JACOBSON et al., 1998; SAWTELL et al., 1998; THOMPSON & SAWTELL, 2000).

Outros sítios de latência têm sido descritos para os alfa herpesvírus: o DNA de BoHV-1 foi encontrado nos centros germinativos da tonsila faríngea (WINKLER et al. 2000), em sangue periférico (FUCHS et al., 1999), linfonodos e baço (MWEENE et al., 1996). Já o DNA de BoHV-5 foi detectado no sistema nervoso central (principalmente no córtex olfatório, cerebelo, tálamo, mesencéfalo e ponte) (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003; HÜBNER et al., 2005). Achados recentes detectaram o DNA viral de BoHV-1 e BoHV-5 em sêmen e no líquido folicular de animais aparentemente saudáveis (OLIVEIRA et al., 2011; HENTGES et al., *in prep*). De fato, a latência sempre tem sido historicamente buscada em gânglios, porém, estes achados, recentes e ao longo dos anos, tem revelado que há genomas virais em várias regiões e com um percentual elevado nas populações estudadas, sugerindo que latência pode ocorrer em outros órgãos e/ou tecidos, questão esta, que necessita ser investigada.

Em contraste com outros alfa herpesvírus de animais e humanos, a infecção latente por BoHV-2 tem sido pouco estudada e muitos aspectos de sua biologia permanecem desconhecidos. A reativação experimental da infecção não foi demonstrada de forma consistente (PROBERT & POVEY, 1975; TURNER et al., 1976; CASTRUCCI et al., 1982) e tentativas de recuperar o vírus via o cultivo de explantes de gânglios nervosos falharam. Além disso, os locais em que o vírus pode permanecer latente são desconhecidos (LETCHWORTH & CARMICHAEL, 1984). Um recente estudo demonstrou que o BoHV-2 pode estabelecer infecção latente em gânglios nervosos e linfonodos de ovinos (TORRES et al., 2009a).

Contrariamente à infecção lítica, na qual há expressão de todos os genes virais, na latência somente há a presença dos chamados transcritos relacionados à latência (do inglês, “latency-related transcript” ou LTRs) que apresentam várias funções inibitórias em nível celular e viral: na apoptose, na entrada da célula na fase S e na expressão da BICP0 (HENDERSON et al., 2004; SCHANG et al., 1996; CIACCI-ZANELLA et al., 1999; GEISER et al., 2002). Os gama herpesvírus codificam um número adicional de genes que têm uma similaridade alta aos genes dos hospedeiros. Supõe-se que estes genes se expressem durante a latência e possam estar envolvidos no redirecionamento da resposta imune e na sobrevivência da célula infectada durante a latência (ACKERMAN, 2006).

Evidências acumuladas sugerem que as células da linhagem monocítica sejam o sítio de latência do BoHV-4, mais especificamente células mononucleares esplênicas (OSORIO & REED, 1983). Embora, de maneira controversa, vários tecidos e tipos de células têm sido considerados também como sítios de latência para o BoHV-4. Dentre eles, o sistema nervoso central (KROGMAN & MCADARAGH, 1982; CASTRUCCI et al., 1987a, b; NAEEM et al., 1991) e os gânglios trigêmeos (HOMAN & EASTERDAY, 1981) já foram apontados como possíveis sítios, apesar de outros autores não detectarem o vírus em tecidos nervosos (OSÓRIO et al., 1982; EGYED et al., 1996). Em outro estudo, o DNA de BoHV-4 foi detectado em tecidos como medula, hipocampo, cérebro e gânglios trigêmeos (EGYED & BARTHA, 1998).

O OvHV-2 estabelece latência nas células sanguíneas mononucleares periféricas de ovinos. Nesta espécie, o genoma de OvHV-2 está geralmente presente numa conformação circular, sendo que os transcritos correspondentes aos genes do ciclo lítico são raramente detectados (THONUR et al., 2006). Em contraste, quando se cultiva linfócitos bovinos infectados verifica-se uma mistura de formas genômicas (circulares e lineares), indicando uma mista forma de infecção: latente e produtiva. Adicionalmente, quando estas células são utilizadas para a infecção de animais experimentais, tais como, coelhos e hamsters, eles desenvolvem uma enfermidade semelhante a FCM (“FCM-like”) (ANDERSON et al., 2007; COULTER et al., 2001; REID et al., 1989; THONUR et al., 2006). O DNA de OvHV-2 já foi detectado em diferentes tecidos em ovinos, inclusive em gânglios trigêmeos (HÜSSY et al., 2002), e também no cérebro de bovinos inoculados experimentalmente (TAUS et al., 2006). Mas os receptores utilizados pelo vírus para infectar células (epiteliais ou linfócitos) para estabelecer infecção latente ou lítica não são conhecidos. Além disso, embora transcritos de DNA tenham sido detectados em leucócitos no sangue, o sítio celular de latência permanece desconhecido (RUSSEL et al., 2009).

A reativação viral na infecção latente por alfa herpesvírus parece ocorrer somente a partir de uma pequena proporção de neurônios infectados (JONES et al., 2006). Esta pode ocorrer após a exposição a estímulos naturais (estresse, transporte, parto, desmame) ou iatrogênicos, como a castração ou tratamento com corticosteróides. Estes fatores fazem com que os capsídeos sejam transportados, via movimento anterógrado, do corpo do neurônio até a extremidade axonal, atingindo as células da mucosa que promovem a montagem e liberação viral (SMITH et al., 2001; ENQUIST et al., 2002).

Na mucosa epitelial, a intensidade da multiplicação viral vai depender fundamentalmente da resposta imune adquirida pela exposição natural ao vírus ou por

vacinação (PASTORET et al., 1979). A multiplicação viral consequente à reativação resulta na disseminação e potencial transmissão de vírus infeccioso a hospedeiros suscetíveis (NARITA et al., 1978; ACKERMANN et al., 1982; THIRY et al., 1987). A habilidade de estabelecer e de reativar infecções latentes constitui-se na principal propriedade biológica desses agentes, uma vez que permite a sua manutenção na natureza (ROCK, 1994).

2.6 – Patogenia e enfermidades relacionadas aos herpesvírus de ruminantes

2.6.1 – BoHV-1 e BoHV-5

A maioria das infecções provocadas por BoHV-1 e BoHV-5 são subclínicas e a severidade da doença é influenciada por vários fatores, tais como a virulência da amostra, imunidade do hospedeiro, idade e presença de infecção bacteriana concomitante (KAASHOEK et al., 1996).

A porta de entrada natural do BoHV-1 é a mucosa do trato respiratório superior ou genital. A transmissão direta ocorre pelo contato “focinho a focinho” e a indireta pode ocorrer através de alimentos contaminados, água ou fômites (MARS et al., 2000; MUYLKENS et al., 2007). A infecção genital requer o contato direto via monta natural ou através de sêmen contaminado (KUPFERSCHMIED et al., 1986).

A replicação no sítio primário da infecção resulta numa massiva produção de vírus. A disseminação viral nos tecidos pode ocorrer por dois diferentes caminhos: os novos vírions saem para o meio extracelular e vão infectar novas células e/ou ocorre a disseminação célula-a-célula (BARANOWSKI et al., 1996; REBORDOSA, et al., 1996). A progênie viral é excretada na mucosa nasal em altos títulos, sendo este o fator responsável por uma rápida disseminação da infecção dentro de um rebanho (ENGELS & ACKERMANN, 1996).

2.6.1.1 – Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)

A IBR é a doença mais reconhecida provocada por BoHV-1. Apresenta alta morbidade e baixa mortalidade. Terneiros inoculados com BoHV-1 apresentaram como sinais clínicos hipertemia (temperatura retal $> 40,5^{\circ}\text{C}$), descarga nasal mucopurulenta, tosse, conjuntivite e lesões ulcerativas na mucosa nasal (MEYER et al., 2001). Vacas adultas acometidas por IBR podem apresentar queda drástica na produção de leite durante alguns dias (HAGE et al., 1998; VAN SCHAİK et al., 1999). O BoHV-5 também é capaz de causar infecções respiratórias semelhantes à IBR (Figura 5).

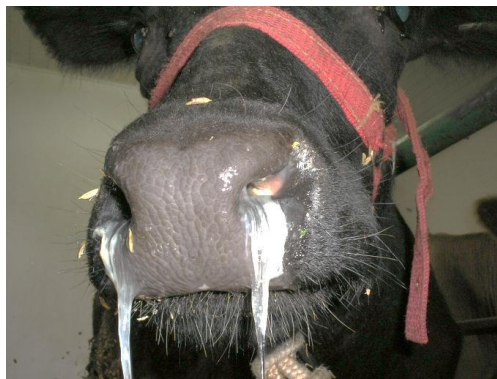


Figura 5 – Fotografia ilustrativa da secreção nasal mucopurulenta de um animal inoculado experimentalmente com BoHV-5 nove dias pós-infecção (CAMPOS et al., 2011).

2.6.1.2 – Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV)

Animais infectados com BoHV-1 por via vaginal podem desenvolver IPV, uma infecção manifestada pela presença de pústulas, intumescimento vulvar e descarga mucopurulenta. O exame interno revela pústulas ou placas de material necrótico branco e material mucopurulento no assoalho vaginal (KAHRS, 2001).

2.6.1.3 – Balanopostite pustular infecciosa (IPB)

Bovinos machos podem desenvolver IPB de forma clínica caracterizadas pela formação de vesículas e pústulas na mucosa do prepúcio e pênis. Estas lesões podem coalescer formando placas e úlceras e infecções bacterianas secundárias podem resultar em áreas cobertas com secreção branco-amarelada até lesões hemorrágicas (VAN OIRSCHOT et al., 1995; VOGEL et al., 2004).

2.6.1.4 – Aborto

Aborto é uma consequência da infecção do trato respiratório ou genital pelo BoHV-1 em vacas soronegativas. Normalmente o aborto ocorre no terço final da gestação, entretanto este período pode ser bastante variável. O intervalo entre a exposição e o aborto pode variar de uma semana até vários meses (KAHRS, 1977; KIRKBRIDE, 1992; MILLER et al., 1991). Há relato da identificação de BoHV-5 recuperado de casos de aborto (SCHUDEL et al., 1986). Além de aborto, podem ocorrer quadros de endometrite, ooforite, mortalidade embrionária com retorno ao cio, natimorto e nascimento de animais fracos (MILLER & VAN DER MAATEN, 1984; KAHRS, 2001).

2.6.1.5 – Encefalite

BoHV-1 e BoHV-5 replicam de maneira similar na mucosa nasal após a inoculação, mas diferem no potencial neuropatogênico. Posteriormente invadem as

terminações nervosas dos neurônios que se localizam nesta região (MEYER et al., 2001). O BoHV-5 invade terminações dos nervos olfatório e trigêmeo e alcança o bulbo olfatório e gânglios trigêmeos (GERDTS et al., 2000). Por outro lado, o BoHV-1 se detém à rota trigeminal e geralmente estabelece a infecção latente nos gânglios trigêmeos, sendo somente esporadicamente responsável por encefalites (D'OFFAY et al., 1993; HORIUCHI et al., 1995; ELY et al., 1996; ROELS et al., 2000; SILVA et al., 2007a).

Após o BoHV-5 atingir o sistema nervoso central, o vírus pode induzir a uma meningoencefalite fatal em bovinos, principalmente em animais jovens (BELKNAP et al. 1994; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; LEMOS, 2005). A doença clínica é caracterizada por tremores, opistótono, cegueira, convulsões, bruxismo, incoordenação motora e morte (BELKNAP et al., 1994; MEYER et al., 2001; VOGEL et al.; 2003; HÜBNER et al., 2005; SILVA et al.; 2006). Nos animais que apresentam encefalite, vírions, antígenos e DNA viral de BoHV-5 são encontrados frequentemente no gânglio trigêmeo, córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo e cerebelo (MEYER et al., 2001; VOGEL et al.; 2003, HÜBNER et al., 2005).

2.6.2 - BoHV-2

A infecção pelo BoHV-2 tem sido associada com duas formas clínicas distintas e bem definidas: a mamilite herpética bovina e a dermatose nodular (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977). Um surto atípico de mamilite, caracterizado por severa deposição de tecido granular difuso na região de tetos e úbere, além de lesões vesiculares na região de focinho, foi descrito nos EUA e associado ao BoHV-2 (KEMP et al., 2008).

2.6.2.1 – Mamilite herpética bovina

A mamilite é uma doença vesicular que afeta a pele do úbere e tetos de vacas em lactação (MARTIN & SCOTT, 1979). Acomete principalmente vacas primíparas de forma subclínica ou acompanhada por sinais clínicos leves (TURNER et al., 1976; SCOTT & HOLLIMAN, 1984). Embora a mamilite seja considerada uma enfermidade frequentemente benigna e auto-limitante, em alguns casos, as vesículas se transformam em pústulas e a fricção no processo de ordenha faz com que as lesões se rompam formando ulcerações. Este processo pode resultar em uma queda significativa na produção de leite, aumento da susceptibilidade da glândula mamária a mastite bacteriana e até mesmo no abate de vacas produtivas devido à mastite crônica (LETCHWORTH & LADUE, 1982; WELLENBERG et al., 2002).

2.6.2.2 – Dermatose nodular atípica

A dermatose nodular atípica (do inglês, “pseudolumpy skin disease” ou PLSD) é uma doença viral de bovinos caracterizada pela erupção de nódulos cutâneos que se assemelham a forma leve da “lumpy skin disease” causada por um poxvírus que afeta caprinos e ovinos, o lumpy skin disease virus (LSDV). A doença é de ocorrência rara e tem sido reproduzida experimentalmente através da inoculação intravenosa do vírus em bovinos jovens. Os nódulos na pele são produzidos por reações inflamatórias resultantes da ativação do complemento pela via clássica, ou seja, há necessidade da presença de anticorpos anti-BoHV-2 para que as alterações patológicas observadas clinicamente sejam desencadeadas (RWEYEMAMU et al., 1968; CASTRUCCI et al., 1975; WOODS et al., 1996).

2.6.3 – BoHV-4

O BoHV-4 possui tropismo por células epiteliais e do estroma uterino. O vírus latente possivelmente é reativado de macrófagos para infectar as células do endométrio. A replicação do vírus através do ciclo lítico ocasiona a morte celular e pode se constituir em um dos fatores que leva à metrite (DONOFRIO et al., 2007). Foi através do isolamento de uma amostra de BoHV-4 de um caso de metrite que se estabeleceu a primeira associação entre este vírus e infecção uterina (PARKS & KENDRICK, 1973). Há relatos de infecções uterinas relacionadas ao BoHV-4 também na Itália (CASTRUCCI et al., 1986), nos EUA (EVERMANN et al., 1985; FRAZIER et al., 2001) e na Hungria (EGYED, et al., 2011). Casos de orquite e epididimite relacionados a infecção por BoHV-4 foram evidenciados em touros na Bélgica (THIRY et al., 1981). O BoHV-4 foi ainda relacionado com mastite em um estudo realizado em rebanhos leiteiros na Holanda (WELLENBERG et al., 2000).

2.6.4 – OvHV-2

2.6.4.1 - Febre catarral maligna

A FCM é uma doença infecciosa, viral, sistêmica, altamente fatal, com distribuição geográfica ampla. Além de bovinos, afeta diversas espécies de ruminantes silvestres e suínos (LØKEN et al., 1998; LI et al., 1999; AUDIGE et al., 2001; DRIEMEIER et al., 2002; SMITH, 2002). Caracteriza-se por febre alta, depressão, corrimento nasal e ocular, erosões e ulcerações na mucosa do trato respiratório superior, ceratoconjuntivite, linfadenopatia, enterite hemorrágica, diarreia, encefalite, exantema cutâneo e artrite (BARKER et al., 1993; SMITH, 2002). A forma FCM associada a gnus (*Conochaetes taurinus*) é induzida pelo AIHV-1 (PLOWRIGHT, 1990; MURPHY et al., 1999). Em locais onde não há gnus, mas há criação de ovinos, pode ocorrer a forma denominada FCM

associada a ovinos. Nesta, ovinos portadores do vírus são responsáveis pela infecção de bovinos (ROIZMAN et al., 1981; BRIDGEN & REID, 1991). As manifestações clínicas e patológicas das formas induzidas por AIHV-1 e OvHV-2 são as mesmas, apesar das diferenças epidemiológicas entre as duas (SMITH, 2002).

2.7 – Diagnóstico laboratorial

A confirmação laboratorial da suspeita de infecção por herpesvírus de ruminantes pode ser obtida por isolamento viral (exceto OvHV-2), testes sorológicos, imunohistoquímica, ou identificação do DNA viral por técnicas moleculares.

2.7.1 – Isolamento viral

O isolamento de BoHV-1 e BoHV-5, quando em casos clinicamente evidentes, pode ser realizado com relativa facilidade, seguindo métodos usuais de isolamento viral. O vírus encontra-se em quantidades que permitem isolamento sem dificuldade em secreções ou tecidos de animais infectados (ROEHE et al., 1997a; SPILKI et al., 2002; ESTEVES, et al., 2003). Suspensões de tecidos ou secreções são previamente filtradas e inoculadas sobre cultivos celulares. Após um período variável de incubação, a presença de vírus é evidenciada pelo efeito citopático (ECP) característico. A confirmação do isolamento pode ser feita por imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase (IPX) (WEIBLEN et al., 1992; ROEHE et al., 1997b), utilizando anticorpos monoclonais específicos (SOUZA et al., 2002).

Dificuldades de isolamento do BoHV-2 de lesões de mamilite herpética têm sido relatadas em vários estudos (MARTIN et al., 1969; MARTIN & SCOTT, 1979; WESTBURY, 1981). Em todos eles, somente foi possível isolar o vírus durante a fase exsudativa das lesões, e por um curto espaço de tempo (um a dois dias). O rompimento rápido das vesículas e a dessecação das lesões com formação de crostas dificulta a recuperação de vírus viável (RWEYEMAMU et al., 1968). Porém isto contrasta com a relativa facilidade de isolar o vírus de secreções nasais de cordeiros, provavelmente devido a diferença histológico-funcionais entre o epitélio nasal e o epitélio cutâneo dos tetos e úbere (ALMEIDA et al., 2008).

O BoHV-4 pode ser isolado de suabes de secreções uterinas, oculares e nasais, fragmentos de órgãos e crostas da epiderme. O vírus é capaz de se replicar em células de cultivo primário ou de linhagens de diferentes espécies de animais, tais como: bovinos, ovinos, cabras, suínos, gatos, cães, coelhos, cavalos, perus, galinhas, hamsters, ratos, camundongos, coelhos e furões (GILLET et al., 2004).

2.7.2 – Diagnóstico sorológico

Usualmente, o diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 é realizado através de testes de soroneutralização (SN). A SN é considerada a técnica padrão para detecção de anticorpos neutralizantes contra BoHV (OIE, 2008). Entretanto, esta prova apresenta uma série de variáveis que podem interferir significativamente em sua execução.

O período de incubação da mistura soro/vírus, por exemplo, pode variar entre 1 a 24 horas. Entretanto, há um aumento significativo da sensibilidade na técnica quando o tempo de incubação da mistura soro/vírus é ajustado para 24 horas (PERRIN et al., 1993; KRAMPS et al., 1996; KRAMPS et al., 2004; CAMPOS et al., 2009; CAMPOS et al., 2011).

Além disso, a SN não permite uma diferenciação clara entre animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5 devido o alto grau de reatividade cruzada existente entre estes (ROEHE et al., 1997b; TEIXEIRA et al., 1998; VARELA et al., 2010). Um estudo recente comparou o uso de diferentes subtipos de BoHV-1 e BoHV-5 em teste de SN, revelando uma importante variação dependendo da amostra utilizada como vírus de confrontação. Ainda nesse estudo, comprovou-se que a maior sensibilidade da SN, isto é, a detecção do maior número de amostras soropositivas, somente pode ser alcançada quando os soros positivos para anticorpos frente a pelo menos quatro amostras diferentes de BoHV foram somados (VARELA et al., 2010).

A SN também tem sido utilizada para a detecção de anticorpos anti-BoHV-2. Torres (2009b) identificaram uma prevalência de 24,5% de anticorpos anti-BoHV-2 analisando 2.213 soros de diferentes municípios do RS. A SN também pode ser utilizada para detectar anticorpos anti-BoHV-4 (FRAZIER et al., 2001).

Ensaio do tipo ELISA também estão disponíveis para o diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1, porém poucos para BoHV-5 (PAYMENT et al., 1979; CHO & BOHAC, 1985; KRAMPS et al., 1994; GRAHAM et al., 1997; VAN OIRSCHOT et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2001; WELLENBERG et al., 2001; KRAMPS et al., 2004). No entanto, assim como na SN, alguns autores relatam a ocorrência de reações cruzadas quando amostras positivas para BoHV-5 foram analisadas (MEYER e at., 2001; TEIXEIRA et al., 2001; WELLENBERG et al., 2001). Atualmente não existe teste de ELISA específico para detecção de anticorpos anti-BoHV-2.

Anticorpos anti-BoHV-4 podem ser detectados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) e

imunoperoxidase, ocorrendo a soro conversão entre 14 e 20 dias após a infecção primária (MONGE et al., 2006). Krüger (2012) recentemente desenvolveu um ELISA indireto com isolado brasileiro para detecção de anticorpos específicos anti-BoHV-4.

Os testes sorológicos para a detecção de OvHV-2 em geral têm valor limitado para diagnóstico de casos clínicos de FCM ovino-associada porque somente uma pequena porcentagem de animais soro-converte e, ainda assim, somente nos estágios finais do curso da doença. Além disso, o título de anticorpos é baixo e há reação cruzada com outros herpesvírus (LI et al., 1994, 1996).

2.7.3 – Amplificação de ácidos nucleicos por PCR

A identificação de genomas virais ou fragmentos genômicos destes vírus por técnicas de amplificação de ácidos nucléicos tem sido realizada basicamente através de métodos baseados na PCR (VAN ENGELENBURG et al., 1993; ASHBAUGH et al., 1997). A PCR baseia-se na replicação do DNA e tem como objetivo a amplificação de uma região alvo no DNA viral. Apresenta como vantagens alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução e aplicabilidade em diferentes amostras clínicas. Além disto, pode ser utilizada em amostras que contém vírus inativado ou que mantém o vírus no estado latente (DEBIASI & TYLER, 2004). Diversas provas de PCR têm sido desenvolvidas utilizando iniciadores para genes específicos de BoHV-1 e BoHV-5: *UL44* (VAN ENGELENBURG et al., 1993; ESTEVES et al., 2008;); *US6* (WAGTER et al., 1996); sendo que algumas são capazes de distinguir a infecção por BoHV-1 e BoHV-5 tendo como alvo os genes: *UL44* (ASHBAUGH et al., 1997; CLAUS et al., 2005; CAMPOS et al., 2009); *US6* (ROS et al., 1999) e *UL23* (ALEGRE et al., 2001).

Em relação a BoHV-2 já foram desenhados iniciadores para amplificar regiões dos genes *UL27* (IMAI et al., 2002; TORRES et al., 2009a), *UL24* (MAY, 2002) e *UL22* (KALMAN & EGYED; 2005) para o uso em PCRs com objetivo diagnóstico.

Iniciadores também foram desenhados para diferentes genes de BoHV-4 sendo os que codificam a glicoproteína B (BOERNER et al.; 1999; WELLEMBERG et al., 2000; FRAZIER et al.; 2002; MONGE et al., 2006) e a timidina quinase (EGYED et al., 1996; EGYED & BARTHA, 1998; YAMAMOTO et al., 2000; ASANO et al., 2003; IZUMI et al., 2006) os mais utilizados. Outras PCRs tem com alvo os genes que codificam a proteína maior que se liga ao DNA, denominada MDP (NIKOLIN et al., 2007) e para os genes incluídos nas ORF 1 a 4 (DONOFRIO et al., 2000).

No diagnóstico de FCM ovino-associada, a PCR tem substituído amplamente os testes biológicos de transmissão, a partir do sangue total ou em tecidos colhidos na

necropsia (BAXTER et al., 1993, 1997; LI, H. et al., 1995). A PCR para a forma ovino-associada preconizada pela OIE é baseada nos iniciadores descritos por Baxter (1993). O alvo desta PCR é o gene que codifica uma proteína do tegumento denominada “FGAM-sintase like” a qual é homóloga a família de proteínas eucarióticas denominada “phosphoribosylformylglycinamide”. Outras PCRs têm como alvo a *UL30* (HIMSWORTH et al., 2008) e *UL27* (FOERSTER et al., *in prep.*).

2.7.3.1 - Controle interno

O controle interno (CI) é definido como uma sequência de DNA que pode ser co-amplificada com os mesmos iniciadores utilizados para amplificar o fragmento alvo. O tamanho do CI normalmente difere do tamanho do produto alvo. Sua utilização se torna importante em PCRs padronizadas para uso em diagnóstico clínico visando evitar a ocorrência de resultados falsos negativos, geralmente ocasionados pela presença de inibidores (PALLEN et al., 1992). Podem ser construídos através da inserção, deleção ou substituições de fragmentos de DNA utilizando técnicas de clonagem (COUTLEE, et al., 1995). Também podem ser construídos utilizando somente a PCR sob condições de amplificações não ideais, com baixa temperatura de anelamento e alta concentração de $MgCl_2$ (FORSTER et al., 1994).

Além de evitar resultados falsos negativos, o CI pode ser utilizado para determinar a sensibilidade de uma PCR através da utilização de diluições seriadas (10^{10} , 10^9 , ... 10^3 , 10^2) contendo quantidades conhecidas de moléculas de CI que são submetidas a amplificação. Posteriormente, a quantidade de moléculas amplificada com a menor diluição pode ser adicionada em todas as reações. Após a amplificação, a presença do CI na falta do produto viral, pode ser interpretada como ausência de DNA viral ou, pelo menos, ausência de DNA em quantidades detectáveis pela sensibilidade do método. Por outro lado, a ausência de ambos, o produto viral e o CI, implicam em uma falha na amplificação, o que pode ser considerado um resultado falso negativo (VAN ENGELENBURG et al., 1993).

2.7.3.2 – Diagnóstico de infecções latentes

O número de cópias de DNA viral encontradas nos gânglios trigêmeos pode ser muito baixo (WANG et al., 2005, CAMPOS et al., 2009). Vários trabalhos tiveram como objetivo a aplicação de PCR para identificar e diferenciar BoHV-1 e BoHV-5 em amostras clínicas (ASHBAUGH et al., 1997; ROS et al., 1999; ALEGRE et al., 2001; CLAUS et al., 2005). Nestes trabalhos, diferentes alvos de amplificação foram utilizados e diferentes sensibilidades de detecção foram obtidos. O uso do CI e a baixa sensibilidade aliada a

utilização de duas nested PCRs tipo-específicas permitiu a identificação de infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em gânglios trigêmeos de bovinos (CAMPOS et al., 2009).

O DNA viral também foi detectado por PCR e semi-nested PCR em gânglios trigêmeos, tonsilas e em diversos linfonodos de cordeiros inoculados com o BoHV-2, evidenciando a infecção latente nestes tecidos (TORRES et al., 2009a). A presença do genoma de BoHV-4 foi detectada por uma nested PCR em diversos tecidos coletados de dois bovinos experimentalmente inoculados com o vírus. Os autores demonstraram que um baixo número de partículas virais podem infectar os nódulos linfáticos, e consequentemente, o número de células contendo vírus pode estar abaixo do limite de sensibilidade da PCR, ou seja, a detecção do DNA viral depende do número de moléculas virais nestes tecidos (EGYED & BARTHA, 1998).

Diferentes tecidos de dois bovinos inoculados com OvHV-2 foram examinados quanto à presença de DNA viral utilizando semi-nested ou PCR em tempo real (qPCR). As amostras de um dos bovinos continham um alto número de cópias de DNA viral e foram detectadas vias qPCR. Porém, o número de cópias de DNA viral presente nos tecidos, inclusive no cérebro, foi detectável apenas utilizando a semi-nested PCR no segundo animal inoculado (TAUS et al., 2006).

Todavia, a detecção de um baixo número de cópias virais presentes em amostras clínicas de animais natural ou experimentalmente inoculados depende, sobretudo, da sensibilidade da PCR utilizada (VAN ENGELENBURG et al., 1993). Esta por sua vez é favorecida quando se utiliza uma PCR seguida por uma nested ou semi-nested, devido ao aumento do número total de ciclos.

2.8 – Vacinação e controle

Vários países da Europa têm iniciado programas de controle objetivando a erradicação de BoHV-1 baseados no uso de vacinas marcadoras com o gene da glicoproteína E deletado (gE⁻). Estas, quando utilizadas com a detecção sorológica de anticorpos específicos anti-gE, permitem a discriminação entre animais infectados e vacinados e a posterior eliminação dos animais portadores dos rebanhos (VAN OIRSCHOT et al., 1996b; VAN OIRSCHOT et al., 1997; MARS et al., 2001; LEHMANN et al., 2002).

Acredita-se que os intensivos programas de vacinação contra BoHV-1 usados em países do Hemisfério Norte podem estar relacionados à baixa prevalência de encefalites herpéticas nestas regiões (ACKERMANN & ENGELS, 2006). No Brasil, assim como em

outros países da América do Sul, existem várias vacinas comerciais contra BoHV-1 e algumas contra BoHV-5. Além disto, não existem programas intensivos de vacinação, o que, além da presença de um rebanho grande, falta de outras medidas de controle e ampla disseminação de BoHV-1 e BoHV-5, favorece a manutenção e distribuição destes vírus na população (METZLER et al., 1986; SILVA et al., 2007b; CAMPOS et al., 2009).

2.8.1 – Vacinas contra BoHV-1 e BoHV-5

Apesar de existirem no mercado várias vacinas contra infecções pelo BoHV-1, até o presente existem poucas vacinas contra infecções pelo BoHV-5 (SINDAM, 2012). O nível de proteção cruzada fornecido por vacinas anti-BoHV-1 frente a infecções pelo BoHV-5 pode não ser suficiente para induzir proteção clínica satisfatória (SILVA et al., 2006).

Estudos realizados avaliando a proteção cruzada induzida por uma vacina anti-BoHV-1 contra BoHV-5 demonstraram uma redução do período de excreção viral e no título viral (BRATANICH et al., 1991; CASCIO et al., 1999). Mas a interpretação dos resultados fica comprometida, pois não foi possível reproduzir a enfermidade clínica (encefalite) nos animais durante o desafio.

A eficácia de uma vacina recombinante contendo BoHV-1 gE⁻ foi testada e esta não foi capaz de conferir proteção satisfatória tanto em coelhos como em bovinos frente ao desafio com BoHV-5 (SPILKI et al., 2004; SILVA et al., 2006). Outro estudo analisou a imunogenicidade e a eficácia de vacinas de BoHV-1 e BoHV-5 inativadas contra BoHV-5. Ambas as vacinas induziram uma resposta imune humoral e celular similares. Além disso, os animais vacinados foram parcialmente protegidos contra a infecção por BoHV-5, uma vez que houve redução na excreção viral. Entretanto, 3 de 9 animais vacinados apresentaram sinais clínicos de encefalite, evidenciando que a proteção conferida por tais vacinas foi insatisfatória (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006).

Recentemente, uma vacina contendo antígenos inativados do recombinante BoHV-5, nos quais os genes que codificam a timidina quinase e glicoproteína E foram deletados (gE/TK⁻) induziu resposta sorológica em níveis satisfatórios, constituindo-se, uma alternativa a cepa vacinal diferencial (BRUM et al., 2010). Além disso, em outro experimento terneiros foram vacinados com uma vacina viva com este mesmo recombinante atenuado e, posteriormente, desafiados com um BoHV-1 e BoHV-5 selvagens. Os resultados demonstraram proteção homóloga e heteróloga, sendo o recombinante indicado para a formulação de vacinas visando controlar as infecções BoHV-1 e BoHV-5 (ANZILIERO et al., 2011). Contudo, o desenvolvimento de vacinas

específicas anti-BoHV-5 pode viabilizar alternativas de controle mais eficazes em áreas endêmicas.

2.8.2 – Vacinas contra os demais herpesvírus de ruminantes

Não existem vacinas comerciais disponíveis contra o BoHV-2 e as medidas de controle baseiam-se no isolamento dos animais afetados e em cuidados para evitar a transmissão do agente (SMEE & LEONHARDT, 1994). O BoHV-4 tem sido utilizado como vetor de vacinas para outros herpesvírus, como por exemplo, carreando o gene *US6* que codifica a gD de BoHV-1 (DONOFRIO et al., 2006).

Vacinas contra AIHV-1 estão sendo desenvolvidas (HAIG et al., 2008), porém não existem vacinas contra OvHV-2. As medidas de controle para evitar a FCM ovino-associada incluem minimizar o contato entre bovinos e ovinos, particularmente durante a fase de parição de cordeiros (SMITH, 2002).

3 – CAPÍTULO 1

3.1 – Search for *Bovine herpesvirus 2*, *Bovine herpesvirus 4* and *Ovine herpesvirus 2*

DNA in trigeminal ganglia of cattle

Campos, F.S.^{1*}, Oliveira, M.T.¹, Strelczuck, G.¹, Fontoura, F.E.¹, Arantes, T.S.¹, Franco, A.C.¹, Spilki, F.R.²,
Silva, A.D.³, Hübner, S.O.⁴; Roehe, P.M.^{1,5}

1- Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

2- Molecular Microbiology Laboratory, Institute of Health Sciences, Feevale University, Rodovia RS-239 2755, Novo Hamburgo, Zip code 93352-000, Rio Grande do Sul, Brazil

3- Embrapa CNPSA, BR 153, Km 110, Concórdia, Post box 21, Zip code 89700-000, Santa Catarina (SC), Brazil.

4- Virology Laboratory, Department of Preventive Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas (UFPEL), Pelotas, University Campus, Post Box 354, Zip code 96010-900, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

5- Institute for Veterinary Research "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, Zip code 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

(Artigo a ser submetido a Research in Veterinary Science)

* Corresponding author: Campos, F.S., Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655 Fax +55 51 3308 4111 E-mail: camposvet@gmail.com

Proofs should be sent to: Campos, F.S., Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655 Fax +55 51 3308 4111 E-mail: camposvet@gmail.com

35 **Abstract**

36 In view of our previous findings on the high frequency of detection of *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) and 5
37 (BoHV-5) DNA in trigeminal ganglia (TG) of apparently healthy cattle, the present study was conducted to
38 investigate the presence of genomes of other three important herpesviruses in the same TG: *Bovine*
39 *herpesvirus 2* (BoHV-2, bovine mamillitis virus), *Bovine herpesvirus 4* (BoHV-4) and *Ovine herpesvirus 2*
40 (OvHV-2). Fragments of two hundred TG were collected from one hundred beef cattle and submitted to
41 DNA extraction. A set of PCR, two of which were semi-nested (snPCR), was designed to amplify part of the
42 genes coding for BoHV-2 and BoHV-4 glycoprotein B (gB) and the OvHV-2
43 “phosphoribosylformylglycinamide synthase-like protein” (FGAM-synthetase). An internal control (IC) for
44 each PCR was constructed using the same primer pairs of the first PCR, generating products that could be
45 differentiated from the target fragment. After the construction of ICs, they were used to determine the
46 sensitivity of the PCRs (able to amplify of about 25 copies of IC). DNA of BoHV-2 was found in 2 %
47 (2/100) of the population examined, whereas no BoHV-4 and OvHV-2 DNA could be detected. The two
48 animals in which BoHV-2 DNA was identified, were also co-infected with BoHV-1 and BoHV-5. This report
49 provides evidence that genomes of BoHV-2, a virus usually associated to mamillitis, can be detected in
50 trigeminal ganglia of infected cattle. Moreover, this is the first report a co-infection of TG of cattle with three
51 distinct bovine herpesviruses.

52

53 **Keywords:** *Bovine herpesvirus*; *Ovine herpesvirus*; BoHV-2; BoHV-4; OvHV-2; PCR; latency.

54

55

56 **Introduction**

57 Bovine herpesvirus type 2 (BoHV-2) is classified into the family *Herpesviridae*, subfamily
58 *Alphaherpesvirinae*, genus *Simplexvirus*. Bovine herpesvirus 4 (BoHV-2) and Ovine herpesvirus 2 (OvHV-
59 2), are members of the *Gammapherpesvirinae* subfamily, belong to *Rhadinovirus* and *Macavirus* genus,
60 respectively (Davison et al., 2009). These viruses are found worldwide in cattle populations and are
61 responsible for losses in dairy and beef cattle industry (Ackermann, 2006).

62 Bovine herpesvirus 2 causes two types of diseases in the cattle: bovine mammillitis, characterized by
63 vesicular, ulcerated or necrotic lesions of the teat and udder skin and pseudo-lumpy skin disease,
64 characterized by generalized superficial skin lesions (Gibbs and Rweyemamu, 1977). The infection may be
65 subclinical or relatively mild; however, it can also exhibit the most severe clinical presentation of all the viral
66 diseases that affect the udder skin of dairy cattle (Gibbs, 2004). In addition, infections with BoHV-2 may
67 increase the susceptibility of the mammary gland for bacterial mastitis (Wellenberg et al., 2002). In contrast
68 with other animal and human alphaherpesviruses, the BoHV-2 latent infection has been poorly studied.
69 Torres et al. (2009a) showed that lambs previously intranasally inoculated with BoHV-2 harbored latent viral
70 DNA in trigeminal ganglia, tonsils and regional lymph nodes.

71 Bovine herpesvirus 4 has not yet been clearly associated with a disorder (Donofrio et al., 2007). It was first
72 isolated in Europe from animals with respiratory and ocular diseases by Bartha et al. (1966). Subsequently, it
73 was detected in cattle with a number of other conditions such as metritis, abortion, pneumonia, diarrhea,
74 respiratory infection, mammary dermatitis, as well as in healthy cattle (Egyed et al., 1996; Wellenberg et al.,
75 2002; Ackermann, 2006). Although BoHV-4 is not considered a neurotropic virus, evidence suggests that
76 sites of BoHV-4 latency are the cells of the monocytic lineage, also the virus has been detected in peripheral
77 and/or central nervous system tissues in persistent infections (Egyed and Bartha, 1998).

78 Ovine herpesvirus 2 is the causative agent of the sheep-associated malignant catarrhal fever (MCF), a severe
79 lymphoproliferative syndrome which occasionally affects ruminants (Russell et al., 2009). The virus is
80 transmitted mainly by the respiratory route, probably in aerosols, and can be shed intermittently in nasal
81 secretions (Li et al., 2004; OIE, 2008). The disease is usually fatal in cattle, bison, deer, and other non-
82 ruminant species like pigs (Loken et al., 1998; Ackermann, 2006; Li et al., 2006), the virus persists
83 subclinically in sheep, its natural reservoir, and a high number of ruminants may survive OvHV-2 infections
84 with or without clinical signs of MCF (Vikøren et al., 2006). Monocytes are believed to be the site for latency
85 of this virus (Levy et al., 2012).

86 We have recently demonstrated that BoHV-1 and BoHV-5 DNA can be detected concomitantly in TG of
87 infected cattle (Campos et al., 2009). It has been shown that BoHV-2 can establish latent infection in
88 sensorial ganglia (Letchworth and Carmichael, 1982; Torres et al., 2009a). Despite BoHV-4 and OvHV-2
89 have been associated with different conditions, both viruses have been found in nasal secretions of cattle and
90 have already been detected in TG of animals experimentally inoculated (Dubuisson et al., 1989; Hüseyin et al.,
91 2002; Li et al., 2004). However, the presence of these viruses in TG of naturally infected cattle has not been
92 examined to date. The following study was conducted to examine whether BoHV-2, BoHV-4 and OvHV-2
93 DNA could also be detected in such site.

94

95 **Materials and methods**

96 *Cells and viruses*

97 The CRIB cell line, a bovine viral diarrhea virus-resistant clone derived from Madin-Darby bovine kidney
98 cells (MDBK), was used for virus multiplication and quantitation. The cells were maintained in Eagle's
99 minimal essential medium (E-MEM, Gibco) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco), 10 µg/mL
100 streptomycin (Vitalfarma), 100 µg/mL gentamicin (Gentamax[®], Marcolab), and 2 µg/mL amphotericin B
101 (Cristália). The BoHV-4 strain used in this study belong to the European strain Movar, and was isolated by
102 Bartha et al. (1966).

103

104 *Collection of trigeminal ganglia*

105 Two hundred TG 100 cattle of mixed breeds, both male (17) and female (83), with a mean age of about 4
106 years old were collected in a slaughterhouse in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The samples
107 and the DNA extracts used for the present work are the same than used in a previous study (Campos et al.,
108 2009).

109

110 *Extraction of total ganglion DNA*

111 Fragments of TG of about 50 mg were placed in 1 ml lysis buffer [20 mM Tris-HCl (Affymetrix, USB), pH
112 7.4; 10 mM EDTA (Invitrogen), pH 8.0 and 200 mM NaCl₂ (J.T.Baker[®]); 100 µg proteinase K (BioAmerica
113 Inc.) and 1 % SDS (Serva)] and incubated over-night at 37 °C. After, this mixture was centrifuged at 12.000
114 g for 10 min to precipitate the non-digested material and 400 µl of supernatant was collected. After a
115 standard phenol (Invitrogen) extraction and ethanol (Synth) precipitation, the purified DNA was dissolved in
116 200 µl TE (10 mM Tris pH 7.4; 1 mM EDTA pH 8.0). To check the quantity and quality of the total DNA
117 obtained, 10 µl were analyzed on agarose (Agargen) gel 1.5 % and compared with knowing quantities of
118 phage lambda DNA (New England Biolabs).

119

120 *BoHV-2, BoHV-4 and OvHV-2 PCR assays*

121 In order to detect the low number of viral genomes present in ganglia, it was essential to optimize the PCR
122 and snPCR assays (Table 1).

123 The second reaction (snPCR) to identify BoHV-2 and OvHV-2 DNA used 1 µl of the first reaction as
124 template. All PCR and snPCR assays were performed in the Eppendorf Mastercycler in a final volume of 25
125 µl and contained 1 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 µM of each primer (IDT), 10 % dimethylsulfoxide (DMSO;

126 Nuclear), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10 % of PCR buffer (Invitrogen) and 0.4 mM
127 deoxynucleoside triphosphates (GE Healthcare) per reaction. Conditions of PCR cycles, time and
128 temperature are described in Table 2.

129

130 *Construction of internal control templates*

131 An IC for each PCR assay was constructed through amplification of DNA extracted from TG with the same
132 primer pairs of the first reaction; however, under low stringency conditions of amplification [low melting
133 temperature (50 – 55°C) and high concentration of MgCl₂ (2 mM)]. After electrophoresis, products that
134 differed in size when compared with the PCR target fragments (Table 1) were selected as candidates for IC
135 templates. These fragments (753 bp for BoHV-2, 322 bp for BoHV-4 and 515 bp for OvHV-2) were purified,
136 cloned into pCRTM 2.1 vector (TOPO[®] TA Cloning[®] kit, Invitrogen) and sequenced (Supplementary data 1).
137 The resulting plasmids were used as ICs and used only in the first PCR (ICs were not added in the snPCR).
138 Furthermore, the ICs were used to determine the sensitivity of the PCR assays.

139

140 *Sensitivity of the PCR assays and cares to avoid contamination*

141 The sensitivity of the PCR assays was determined by titration of the IC DNA template using 10-fold serial
142 dilutions of known quantities of IC molecules. Different IC dilutions were used, ranging from 2.5 x 10⁶ to 2.5
143 x 10¹ molecules. PCR assays were optimized to amplify low concentrations of DNA (approximately 20 to 40
144 copies per reaction). We also added to the IC dilutions fixed amounts (200 ng) of the bovine DNA extracted
145 from TG (data not shown). To avoid contamination with PCR products, separated rooms were used to
146 prepare the PCR mixes, extraction of DNA from ganglia and analyses of PCR products. Filter tips were used
147 throughout. Work benches were decontaminated with UV light and negative controls were included in every
148 five PCR reactions.

149

150 *Sequencing of samples*

151 In order to detect BoHV-2 and OvHV-2 DNA, all reactions of the first PCR assay (including apparently
152 negative results), were subjected to snPCR. All PCR products were cloned into pCRTM 2.1 vector
153 (Invitrogen) and submitted to nucleotide sequence analysis. Sequencing was carried out with the Big Dye
154 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, UK) in an ABI-PRISM 3100 Genetic
155 Analyzer (ABI, Foster City, CA), according to the protocol of the manufacturer. The sequences obtained

156 were compared with homologous nucleotide sequences deposited in the GenBank
157 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

158

159 *Phylogenetic analysis*

160 Alignment of the nucleotide sequences was performed using the ClustalW application, version 2.0. The tree
161 was calculated on the computer program MEGA 5, using the Maximum Parsimony method based on the data
162 specific model (Nei and Kumar, 2000). A total of 359 positions were used for the phylogenetic re-
163 construction. Homolog sequences from BoHV-2 and other phylogenetically related herpesviruses were
164 downloaded from GenBank and used for comparisons.

165

166 **Results**

167 *Sensitivity of the PCR assays*

168 The products of 25 molecules of IC were visualized on a 1.5 % ethidium bromide-stained agarose gel in all
169 PCR reactions (Fig. 1a, lane 7; 1b, lane 6 and 1c, lane 7). This implies that the lower detection limit of these
170 PCRs was of about 25 IC molecules. Consequently, to each reaction, 25 molecules of the IC template were
171 added in all the first PCR to detect false negative results.

172

173 *BoHV-2 PCR assay*

174 Two hundred samples of TG extracted DNA were processed in the first PCR and 1 µl of this mixture was re-
175 amplified in the snPCR (Fig. 2). The prevalence of BoHV-2 was 2 % (2/100) in the present study. Sequenced
176 PCR products were 99-100 % identical to BoHV-2 sequences deposited in the GenBank. Interestingly, these
177 two female had already been tested positive for BoHV-1 and BoHV-5 DNA (Supplementary data 2).

178

179 *BoHV-4 and OvHV-2 PCR assays*

180 The result of the PCR assays was negative for all analyzed samples and no evidence for the presence of
181 BoHV-4 and OvHV-2 DNA was observed.

182

183 *Sequences deposited in GenBank and phylogenetic analysis*

184 The two partial sequences amplified from BoHV-2 *gB* gene present in TG were deposited in GenBank
185 (accession numbers JQ958306 and JQ958307). These sequences were 99-100 % identical to BoHV-2
186 sequences available at GenBank database (accession numbers M21628 and M21632). Phylogenetic
187 reconstructions based on the alignment of the *gB* gene nucleotide sequences are shown on Figure 3. The
188 Brazilian isolates are forming a subcluster within the BoHV-2 group.

189 These 2 sequences displayed 0.8 % (JQ958306) and 0.6 % (JQ958307) nucleotide differences (data not
190 shown), in comparison with the other BoHV-2 *gB* genes. These nucleotides differences lead amino acid
191 changes (T 174 I and Q 205 L) in *gB* in relation to the sequences deposited in GenBank (Fig. 4).

192

193 Discussion

194 In the present study, three PCR assays to detect BoHV-2, BoHV-4 and OvHV-2 DNA were set up, optimized
195 and used to identify the presence of viral DNA in bovine TG. To improve the sensitivity and to avoid false
196 negative results, ICs were constructed for each PCR assay. An essential requirement of an IC template is that
197 it should be amplified with the same efficiency as the viral template. Generally, the number of viral DNA
198 molecules present in the TG is low (Wang et al., 2005). Therefore, the amount of IC template must be as low
199 as possible, but always detectable after addition of extracted DNA. Serial tenfold dilution of the IC molecules
200 were added just to find the lower detection limit for the ICs and to avoid failures in amplification. False
201 negative results may be caused by the presence of impurities, excess of DNA or residual traces of extraction
202 reagents in the samples, which have been reported to inhibit Taq polymerase (Van Engelenburg et al., 1993).
203 Therefore, the use of ICs is important for the study presented here mainly because: (1) it reduces the number
204 of false negative results and (2) it helps in the PCR optimization and detection of the viral target product in
205 the absence of a positive control (as occurred in the detection of BoHV-2).

206 As previously mentioned, the sensitivity of these PCR assays was accurately determined so that non
207 detection of viral DNA, as in the case of BoHV-4 and OvHV-2, could neither be attributed to lack of
208 sensitivity nor to sequence variation of the target regions. BoHV-4 and OvHV-2 have already been detected
209 in bovines in Brazil, indicating that these viruses circulate among Brazilian cattle (Garmatz et al., 2004;
210 Costa et al., 2011). However, the virus identification has been performed in tissues and/or secretions of ill
211 animals, and not, necessarily, in latency sites. In this study, TG were collected from healthy animals to
212 investigate latent infections. The lack of detection of BoHV-4 and OvHV-2 DNA in TG may indicate a
213 restrict distribution of these virus in Brazil when compared to BoHV-1 and 5 (Campos et al., 2009) or,
214 alternatively, TG are not the preferential latency sites of these two viruses. The results of this study
215 demonstrate that the adapted BoHV-2 gB-PCR is reliable to be used for the detection of BoHV-2 DNA in
216 bovine TG. Moreover, we chose to use a PCR to detect gB sequences because this gene is one of the most
217 conserved among the members of the family *Herpesviridae* (Nixdorf et al., 2000). In the study of Wellenberg
218 et al. (2001) a PCR for BoHV-4 gB had been compared with another PCR (for the TK gene) and proven to be
219 more sensitive. For this reason, the PCR targeting BoHV-4 gB was chosen. The OvHV-2 PCR was
220 previously described by Baxter et al. (1993) and the technique is recommended by the OIE (2008) to detect
221 OvHV-2. However, improved primers were used to optimize the annealing temperature of the PCR,
222 increasing the sensitivity of the test (Wu et al., 1991).

223 We found BoHV-2 DNA in 2 % of the sampled population in Southern Brazil. Antibodies BoHV-2 were
224 previously detected in Brazilian cattle (Torres et al., 2009b). Kálmán and Egyed (2005) detected BoHV-2
225 DNA in nonbovine ruminants (roe deer, red deer, fallow deer, mouflon and domestic sheep) and the
226 prevalence in these species ranged from 3 % to 50 %. The difference found, however, could be due to the
227 latency site studied. While we analyzed TG, the previous study used other tissues to detected viral DNA
228 (lymph nodes or spleen). Interestingly, Torres et al. (2009a) examined the distribution of latent BoHV-2
229 DNA in different tissues [dorsal root (lumbar) ganglia, trigeminal ganglia and lymph nodes] and found that
230 lambs could have BoHV-2 positive lymph nodes and negative TG and the opposite situation was also found.
231 Our findings confirm that TG are the sites in which BoHV-2 may remain latent.

232 Phylogenetic analysis of the detected sequences (512 bp segment of the gB gene) suggests that the evaluated
233 samples in this study are genetically related to the samples described by Hammerschmidt et al. (1988). They
234 show that gB BoHV-2 gene is highly conserved compared to gB of Human herpesvirus 1. The phylogenetic
235 results obtained in this study, based on the distance of the detected samples, originated a new subcluster of
236 BoHV-2, suggesting a difference between our and the Genbank sequences. These differences lead to two
237 (JQ958306) and one (JQ958307) amino acid changes in relation to the corresponding amino acid sequences,
238 suggesting that there may be sequence variations and it may be related to the geographical localization of
239 viruses.

240 The detection of BoHV-2 DNA in TG tissues shown here confirm that bovines can also be co-infected with
241 more than one herpesvirus (Campos et al., 2009). To our knowledge, this is the first time that a co-infection
242 with three different Bovine herpesviruses is described in cattle. Co-infections with several herpesviruses have
243 been commonly described in humans (Koelle and Corey, 2008).

244

245 **Conclusions**

246 In this study, three PCR assays to detect BoHV-2, BoHV-4 and OvHV-2 were optimized and used to identify
247 the presence of viral DNA in TG. An IC for each PCR was constructed, using the same primer pairs of the
248 first PCR, and the lower detection limit was of about 25 molecules for all PCR assays. Bovine herpesvirus 2
249 was detected, whereas no evidence of BoHV-4 and OvHV-2 was observed. Prevalence of BoHV-2 was from
250 2 % (2/100) in the studied population. Sequenced PCR products were 99-100 % identical to BoHV-2
251 sequences deposited in the GenBank. The detection of BoHV-2 is important to demonstrate that bovines can
252 be co-infected with more than one herpesvirus, since the two BoHV-2 positive animals were already co-
253 infected with BoHV-1 and BoHV-5. This is the first report that the co-infection with three bovine
254 herpesviruses has been identified.

255

256 **Conflict of interest statement**

257 All authors declare that there are no financial or other relationships that might lead to a conflict of interest.

258 All authors have seen and approved the manuscript and have contributed significantly to the work.

259 **Acknowledgments**

260 The authors would like to thank the collaborators of the Virology Laboratories of UFRGS and FEPAGRO
261 Animal Health – IPVDF. We thank Dr Alejandra Romera (National Agricultural Technology Institute, INTA,
262 Argentina) for generous gift of the BoHV-4 sample Movar. F.S. Campos is a Ph.D. student at the
263 Postgraduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary (PPGCV/UFRGS/Brazil), grantees of
264 CAPES. P. M. Roehe, A. C. Franco and F. R. Spilki are CNPq research fellows. Work supported by CNPq,
265 FINEP and CAPES.

266

267 **References**

- 268 Ackermann, M., 2006. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 113, 211-222.
- 269 Bartha, A., Juhasz, M., Liebermann, H., 1966. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory
270 disease and keratoconjunctivitis. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.* 16, 357-358.
- 271 Baxter, S.I.F., Pow, I., Bridgen, A., Reid, H.W. 1993. PCR detection of the sheep-associated agent of
272 malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* 132, 145-159.
- 273 Campos, F.S., Franco, A.C., Hübner, S.O., Oliveira, M.T., Silva, A.D., Esteves, P.A., Roehe, P.M.,
274 Rijsewijk, F.A., 2009. High prevalence of coinfections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in
275 southern Brazil. *Vet. Microbiol.* 139, 67-73.
- 276 Costa, G.A., Vasconcelos, A.C., Bomfim, M.R.A., Amorim, H.B., Lima, G.B.L., Coelho, F.M., Resende, M.
277 2011. Neurological disorder in cattle associated with Bovine herpesvirus-4. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63,
278 828-835.
- 279 Davison, J.A., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., Mcgeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman,
280 B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171-177.
- 281 Donofrio, G., Herath, S., Sartori, C., Cavirani, S., Flammini, C.F., Sheldon, I.M., 2007. Bovine herpesvirus 4
282 (BoHV-4) is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction.* 134, 183-
283 197.
- 284 Dubuisson, J., Thiry, E., Bublot, M., Thomas, I., Van Bresseem, M.F., Coignoul, F., Pastoret, P.P., 1989.
285 Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus
286 with dexamethasone. *Vet. Microbiol.* 21, 97-114.
- 287 Egyed, L., Ballagi-Pordány, A., Bartha, A., Belák, S., 1996. Studies of in vivo distribution of bovine
288 herpesvirus type 4 in the natural host. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1091-1095.
- 289 Egyed, L., Bartha, A., 1998. PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. *Vet. Res.*
290 *Commun.*, 22, 209-216.
- 291 Garmatz, S.L., Irigoyen, L.F., Rech, R.R., Brown, C.C., Zhang, J., Barros, C.S.L. 2004. Malignant catarrhal
292 fever in cattle in Rio Grande do Sul, Brazil: experimental transmission to cattle and characterization of the
293 etiological agent. *Pesq. Vet. Bras.* 24, 93-103.
- 294 Gibbs, E.P. and Rweyemamu, M.M., 1977. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. *Vet.*
295 *Bull.* 47, 411-425.
- 296 Gibbs, E. P. J., 2004. Bovine herpesvirus 2 infections. In *Infectious Diseases of Livestock*. Eds Coetzer, J. A.
297 W. and Tustin, R. C. Oxford University Press, Oxford, 887-894.

- 298 Hammerschmidt, W., Conraths, F., Mankertz, J., Pauli, G., Ludwig, H., Buhk, H.J. 1988. Conservation of a
299 gene cluster including glycoprotein B in bovine herpesvirus type 2 (BHV-2) and herpes simplex virus type 1
300 (HSV-1). *Virology* 165, 388-405.
- 301 Hüsey, D., Janett, F., Albini, S., Stäuber, N., Thun, R., Ackermann, M., 2002. Analysis of the pathogenetic
302 basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4700-4704.
- 303 Kálmán, D. and Egyed, L. 2005. PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in
304 Hungary. *J. Wild. Dis.* 41, 482-488.
- 305 Koelle, D.M. and Corey, L. 2008. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu.*
306 *Rev. Med.* 59, 381-395.
- 307 Letchworth, G.J. and Carmichael, L.E., 1982. Bovid herpesvirus 2 latency: failure to recover virus from
308 central sensory nerve. *Can. J. comp. Med.* 46, 76-79.
- 309 Levy, C.S., Hopkins, J., Russell, G.C., Dalziel, R.G. 2012. Novel virus-encoded microRNA molecules
310 expressed by ovine herpesvirus 2-immortalized bovine T-cells. *J. Gen. Virol.* 93, 150-154.
- 311 Li, H., Taus, N. S., Jones, C., Murphy, B., Evermann, J. F., Crawford, T. B., 2006. A devastating outbreak of
312 malignant catarrhal fever in a bison feedlot. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 119-123.
- 313 Li, H., Taus, N.S., Lewis, G.S., Kim, O., Traul, D.L., Crawford, T.B., 2004. Shedding of Ovine Herpesvirus
314 2 in Sheep Nasal Secretions: the Predominant Mode for Transmission. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5558-5564.
- 315 Loken, T., Aleksandersen, M., Reid, H., Pow, I., 1998. Malignant catarrhal fever caused by ovine
316 herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet. Rec.* 143, 464-467.
- 317 Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, NY, 333pp.
- 318 Nixdorf, R., Klupp, B.G., Karger, A., Mettenleiter, T.C. 2000. Effects of truncation of the carboxy terminus
319 of Pseudorabies virus glycoprotein B on infectivity. *J. Virol.* 74, 7137-7145.
- 320 OIE, World Organization for Animal Health, 2008. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial*
321 *animals. Chapter 2.4.15: Malignant Catarrhal Fever - Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and*
322 *Control References. OIE Terrestrial Manual.* 1, 779-788.
- 323 Russell, G.C., Stewart, J.P., Haig, D.M. 2009 Malignant catarrhal fever - A review. *Vet Journal* 179, 324-
324 335.
- 325 Torres, F.D., Almeida, S.R., Silva, M.S., Weiblen, R., Flores, E.F., 2009a. Distribution of latent bovine
326 herpesvirus 2 DNA in tissues of experimentally infected sheep. *Res. Vet. Sci.* 87, 161-166.
- 327 Torres, F.D., Bernardes, L.M., Weiblen, R., Flores, E.F. 2009b. Prevalence of antibodies to bovine herpes
328 mammillitis virus in cattle of Rio Grande do Sul , Brazil. *Ciência Rural* 39, 1901-1904.

- 329 Van Engelenburg, F.A.C., Maes, R.K., Van Oirschot, J.T., Rijsewijk, F.A.M., 1993. Development of a rapid
330 and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *J. Clin.*
331 *Microbiol.* 31, 3129-3135.
- 332 Vikøren, T., Li, H., Lillehaug, A., Jonassen, C.M., Böckerman, I., Handeland, K., 2006. Malignant catarrhal
333 fever in free-ranging cervids associated with OvHV-2 and CpHV-2 DNA. *J. Wildl. Dis.* 42, 797-807.
- 334 Wang, K., Lau, T. Y., Morales, M., Mont, E.K., Straus, S.E., 2005. Laser-capture microdissection: refining
335 estimates of the quantity and distribution of latent Herpes simplex virus 1 and Varicella-zoster virus DNA in
336 human trigeminal ganglia at the single-cell level. *J. Virol.* 79, 14079-14087.
- 337 Wellenberg, G.J., van der Poel, W.H.M., Van Oirschot, J.T., 2002. Viral infections and bovine mastitis: a
338 review. *Vet. Mic.* 88, 27-45.
- 339 Wellenberg, G.J., Verstraten, E.R.A.M., Belak, S., Verschuren, S.B.E., Rijsewijk, F.A.M., Peshev, R., Van
340 Oirschot, J.T. 2001. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR
341 assays in bovine milk. *J. Virol. Methods* 97, 101-112.
- 342 Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J., Wallace, R.B. 1991. The effect of temperature and
343 oligonucleotide primer length on specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction.
344 *DNA Cell Biol.* 10, 233-238.
- 345

346 **Table 1.** Descriptions of the primers, size of products and target genes used in the PCR and snPCR assays.
347

Virus	Reactions	Primers	Size of PCR products	Target gene	GenBank Access number	Reference
BoHV-2	PCR ^a	Forward ^c 5'-TATGGAGAAGGAAGAGCCCG-3' Reverse1 ^c 5'-TTTTAGCCGCGTGGTGTGC-3'	608 bp	gB ^d	M21628, region: 6363..6970	Torres et al., 2009a
	snPCR ^b	Forward ^c 5'-TATGGAGAAGGAAGAGCCCG-3' Reverse2 ^c 5'-CGGTGGTCTCAAGTTGTTC-3'	512 bp	gB ^d	M21628, region: 6363..6874	Torres et al., 2009a
BoHV-4	PCR ^a	gB1 5'- CCCTTCTTTACCACCACCTACA-3' gB2 5'-TGCCATAGCAGAGAAACAATGA-3'	615 bp	gB ^e	AF318573, region: 11381..11995	Wellenberg et al., 2001
OvHV-2	PCR ^a	P556modF ^c 5'-GGTATATGAATCCAGATGGC-3' P755modR ^c 5'-AAGCACCAGTTATGCATCTG-3'	411 bp	FGAM-synthase ^f	DQ198083, region: 121120..121530	Baxter et al., 1993
	snPCR ^b	P556modF ^c 5'-GGTATATGAATCCAGATGGC-3' P555modR2 ^c 5'-GTTTCTGGGGTAGTGCG-3'	197 bp	FGAM-synthase ^f	DQ198083, region: 121120..121316	Baxter et al., 1993

348
349
350
351
352
353
354
355

a Polymerase chain reaction (PCR).

b Semi-nested polymerase chain reaction (snPCR).

c Primers designed with modifications.

d Glycoprotein B (gB), UL 36.

e Primers amplify a region comprising a small portion (50 nt) of ORF 7 (transport protein) and a larger portion (575 nt) of ORF 8 (glycoprotein B).

f Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase-like protein, ORF 75.

356 **Table 2.** Description of the number of cycles, temperature and time used in the PCR assays.

Reaction	Initial denaturation	Numbers of cycles	Step 1	Step 2	Step 3	Final extension
PCR to BoHV-2	94 °C 3 min ^a	35 cycles ^b	94 °C 50 sec ^a	62 °C 50 sec	72 °C 50 sec ^a	72 °C 3 min ^a
snPCR to BoHV-2	94 °C 3 min ^a	35 cycles ^b	94 °C 50 sec ^a	65 °C 50 sec	72 °C 50 sec ^a	72 °C 3 min ^a
PCR to BoHV-4	94 °C 3 min ^a	35 cycles ^b	94 °C 50 sec ^a	59 °C 50 sec	72 °C 50 sec ^a	72 °C 3 min ^a
PCR to OvHV-2	94 °C 3 min ^a	32 cycles ^c	94 °C 50 sec ^a	51 °C 50 sec	72 °C 50 sec ^a	72 °C 3 min ^a
snPCR to OvHV-2	94 °C 3 min ^a	32 cycles ^c	94 °C 50 sec ^a	58 °C 50 sec	72 °C 50 sec ^a	72 °C 3 min ^a

357
358
359
360

a The same temperature and time for all reactions.

b The same numbers of cycles of BoHV-2 PCR/snPCR and of BoHV-4 PCR.

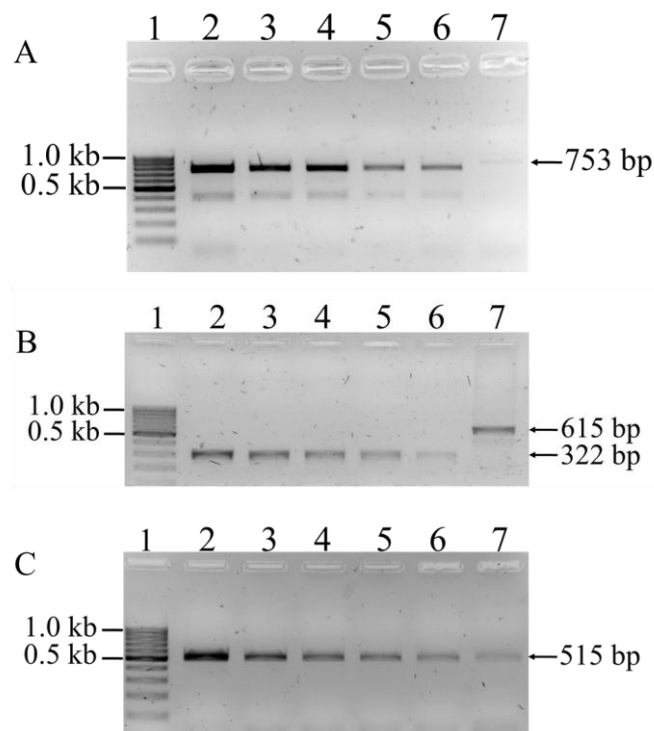
c The same numbers of cycles of OvHV-2 PCR/snPCR.

361

362 Figure 1a. Titration the BoHV-2 IC DNA template using knowing quantities of IC molecules. A 10-fold
 363 dilution series of this mixture was amplified by BoHV-2 PCR, and 5 μ l of the PCR reaction mixture (25 μ l)
 364 were analyzed by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel. The total number of molecules added to the reaction
 365 was 2.5×10^6 (lane 2), 2.5×10^5 (lane 3), 2.5×10^4 (lane 4), 2.5×10^3 (lane 5), 2.5×10^2 (lane 6) and 2.5×10^1
 366 (lane 7). Lane 1: 100 bp DNA Ladder (BioLabs). The size of the BoHV-2 IC template is 753 bp.

367 Figure 1b. Titration the BoHV-4 IC DNA template using knowing quantities of IC molecules. A 10-fold
 368 dilution series of this mixture was amplified by BoHV-4 PCR, and 5 μ l of the PCR reaction mixture (25 μ l)
 369 were analyzed by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel. The total number of molecules added to the reaction
 370 was 2.5×10^5 (lane 2), 2.5×10^4 (lane 3), 2.5×10^3 (lane 4), 2.5×10^2 (lane 5), 2.5×10^1 (lanes 6 and 7). Lane
 371 1: 100 bp DNA Ladder (BioLabs). Lane 7 included 200 ng of DNA extracted from the sample MOVAR
 372 grown in CRIB cells, and the absence of a visible IC band in the presence of viral DNA is due to competition
 373 between both templates. The size of the BoHV-4 IC template is 322 bp and the target PCR fragment is 615 bp.
 374 bp.

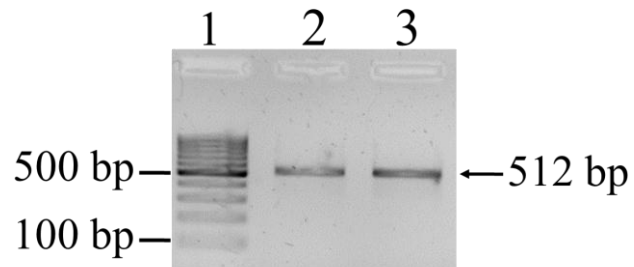
375 Figure 1c. Titration the OvHV-2 IC DNA template using knowing quantities of IC molecules. A 10-fold
 376 dilution series of this mixture was amplified by OvHV-2 PCR, and 5 μ l of the PCR reaction mixture (25 μ l)
 377 were analyzed by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel. The total number of molecules added to the reaction
 378 was 2.5×10^6 (lane 2), 2.5×10^5 (lane 3), 2.5×10^4 (lane 4), 2.5×10^3 (lane 5), 2.5×10^2 (lane 6) and 2.5×10^1
 379 (lane 7). Lane 1: 100 bp DNA Ladder (BioLabs). The size of the OvHV-2 IC template is 515 bp.



380

381

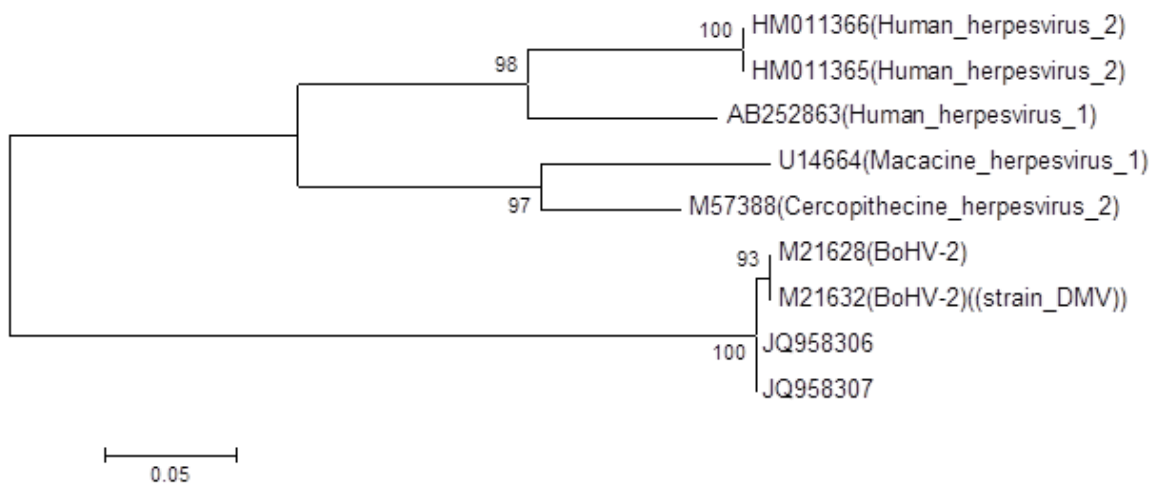
382 Figure 2. Bovine herpesvirus 2 positive samples isolated from TG detected by snPCR. Five microliters out of
383 25 μ l were analyzed on a 1.5 % agarose gel. Lane 1: 100 bp DNA Ladder (BioLabs), lanes 2 and 3: BoHV-2
384 positive samples. The size of the BoHV-2 snPCR product is 512 bp.



385

386

387 Figure 3. Maximum likelihood tree showing the phylogenetic relatedness between Brazilian BoHV-2
 388 samples, other BoHV-2 sequences previously reported and other herpesviruses. The tree with the highest log
 389 likelihood (-1431.0586) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is
 390 shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically as follows.
 391 When the number of common sites was < 100 or less than one fourth of the total number of sites, the
 392 maximum parsimony method was used; otherwise BIONJ method with MCL distance matrix was used. The
 393 tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis
 394 involved 9 nucleotide sequences.



395

396

397 Figure 4. Comparison of the amino acid sequences of the gB fragment of BoHV-2 obtained from two bovine
 398 TG. Nucleotides differences lead to 2 and 1, respectively, amino acid changes, in gB in relation to the gB
 399 BoHV-2 sequences deposited in GenBank.

```

      80      90      100      110      120      130      140      150      160      170
M21628 (BoHV-2)      KEEFDYTLAPRASFDAPGTPKVFAMPGVTP. . . . . P.SGNASEPADPAELRADLRGLKGSDDPNFYVCFPPPTGATVVRLEEPKCFELPKGLNFTGIAVTFKE
M21632 (BoHV-2) (strain_DMV)
JQ958306
JQ958307
AB252863 (Human herpesvirus_1)  PPA.G.P..NGGPETEEE..K.K..NAAA..AGD..TVA.GH.T..EH..DI.AENT.A.....QF.Q..R..TR.E.Q.Y.....V...
U14664 (Macacine herpesvirus_1)  RAS.APP..GHA.VSR..DNDGEA.AA.GA.GT..VE.GH.T..EN..DI.ALDG.AT.....QF.Q...RA.H.Q.Y.....I...
M57388 (Cercopithecine HV)      PTP..P.LPEDEEV...EDGEGV.....AA..VE.GR.T..E...EI.ARDG.AT.....QF.Q...RA.D.Q.Y.....V...
HM011366 (Human herpesvirus_2)  PPV.S.P.DHQGPE.ENQ..P.KR.EA....DA..TVA.GH.T...H..EI.VENA.AQ.....QF.Q..R..TR.E.Q.Y.....V...
HM011365 (Human herpesvirus_2)  PPV.S.P.DHQGPE.ENQ..P.KR.EA....DA..TVA.GH.T...H..EI.VENA.AQ.....QF.Q..R..TR.E.Q.Y.....V...

      180      190      200      210      220      230      240
M21628 (BoHV-2)      NLAPYKFKATMYKAVTVASVMSGYSYNQFMNIFEDRAIPFEEIVDRIHGRGMCLSTAKVVRNNLETT
M21632 (BoHV-2) (strain_DMV)
JQ958306
JQ958307
AB252863 (Human herpesvirus_1)  .I.....D...SQ..F.HR.S...G.....V...VI.K.NAK.V.R.....M.S
U14664 (Macacine herpesvirus_1)  .I.....D...SQ..F.HR.S...G.....V...VI.K.NA..V.R.....M.S
M57388 (Cercopithecine herpesvi  .I.....D...SQ..F.HR.S...G.....V...VM.K.NAK.V.R.....M.S
HM011366 (Human herpesvirus_2)  .I.....D...SQ..F.HR.S...G.....V...VI.K.NAK.V.R.....M.S
HM011365 (Human herpesvirus_2)  .I.....D...SQ..F.HR.S...G.....V...VI.K.NAK.V.R.....M.S
  
```

400

401
402 **Appendix A. Supplementary data**

403 **Supplementary data 1** - Description of the chimeric sequences originated from the construction of internal
404 controls to BoHV-2, BoHV-4 and OvHV-2.

405
406 >Seq1: Chimeric sequence Bovine herpesvirus type 2 internal control is showed in the 5' - 3' sense. The
407 sequences in bold correspond to the primers (forward and reverse1) used in BoHV-2 PCR (first reaction).
408

409 Showing 753 bp region from base 1 to base 753.

410 **TATGGAGAAGGAAGAGCCCG**ATTGGCCGTACGCCGCGTTCCAACCCGGCGACCTATACCGGGCGTCTTTACGCC
411 CGTACGTGAACCTCTTTGCCGGCGTGCCGGAAGCGCGTTTACGCGGCTATACGCCAGGCCGTTTCAGCTTTAAC
412 GTGCGCGGGCGCCGCTGTGAAGCGTGCCAGGGCGACGGCGTAATCAAGGTTGAGATGCACTTCCTGCCGGATA
413 TCTACGTGCCGTGCGACCAGTGCAATGGTAAGCGTTATAACCGTGAAACGCTGGAGATTAAGTACAAAGGCAA
414 GACCATCCACGAAGTGCTGGATATGACCATCGAAGAGGCACGCGAGTTCTTTGACGCCGTCCCTGCGCTGGCG
415 CGTAAGCTGCAAACCCTCATGGATGTGGGTCTGACCTATACTCGTCTGGGGCAGTCAGCGACAACGCTGTCCG
416 GCGGTGAAGCGCAGCGCGTGAAGCTGGCGCGTGAGCAGTCCAAACGCGGTACCGGTCAGACGCTGTATATTCT
417 GGATGAGCCGACCACCGCCTGCACTTTGCGGATATCCAGCAGCTGCTGGACGTGCTGCACCAGCTGCGCGAT
418 CAGGGCAACACCATCGTGGTGATAGAGCACAACTGGACGTGATTAACCCGCTGACTGGATTGTCGATCTCG
419 GCCCGGAAGGGCGCAGCGGGCGCGGTGAAATCCTCGTCTCCGGTACGCCAGAGACCGTTGCAGAGTGCGAAGC
420 CTC**GCACACCACGCGGCTAAAAA** .

421
422 >Seq2: Chimeric sequence Bovine herpesvirus type 4 internal is showed in the 5' - 3' sense. The sequences
423 in bold correspond to the primers (gB1 and gB2) used in BoHV-4 PCR.
424

425 Showing 322 bp region from base 1 to base 322.

426 **CCCTTCTTTACCACCACCTACA**GTTCGATAGGTGTGCAATATGCTACTGGAGCAGAGCAGAGAAATAGCTACAG
427 AAAGAATGAAGAGGCTGAGCCAAAGCAGAAATGGCACACAGTTGTGTTTGTCTGATGGTGAAAGTAAAGTCCA
428 AACTGTAAAGAATAATATTGCAAAGGAACCTGTAAGGTCCATGAATCAAGGTAAATTGGATGTGGTCAAACA
429 GGAGATGGCAAGAACAACATCCACATTTTAGGAATCAGTGAACATAAATGGATGGGAATGGGTGAATTTAAT
430 TCAGATGAT**CATTGTTTCTCTGCTATGGCA** .

431
432 >Seq3: Chimeric sequence Ovine herpesvirus type 2 internal control is showed in the 5' - 3' sense. The
433 sequences in bold correspond to the primers (P556modF and P755modR) used in OvHV-2 PCR (first
434 reaction).
435

436 Showing 515 bp region from base 1 to base 515.

437 **GGTATATGAATCCAGATGGC**GCACACAGTTCTGTCTGGGGCCACCGCCCTCAGGCCTGGCCTTGGCCACATAA
438 GGGTGGCGCTGAAGGCCAGAGGCAACGCTAGCAGGTCATAGAGCCCCCGTGCCTTCCTAGGGCCCTTCTCTTT
439 GAGGAGCACACACAGACCCAGCCAGGGCCGCCCAAAGTCCCTCCCTCCTTAAATGCTCCAAATTTGGAATTG
440 GAGCTCCCTAAATACTTGCTGTGTGACTTTGGGCACCTCTTGTGCGTCTCTGGGCCTCGTGTGTAAATGGA
441 GGACATCGTCACGGAGACTGTGGCTAAGGGTCTAGAGGAGTTTCCAGAGGGTGAAGTCCACAGAATCTCAC
442 CAGGAGGGGCGAGCCAGCCAAGGATTCAGACCCACCTGGGGGGGTGCATCGAGGAGGCATCAGGTCATCTTGG
443 CACCTGGAGAAAGTAGGCCCTTGTGCTTCGCCTCATTTTGTCTATGCCCTCACTAAA**CAGATGCATAACTGGT**
444 **GCTT** .
445

446 **Supplementary data 2** - Description of data collection of trigeminal ganglia

Data collection of trigeminal ganglia				nPCR ^a		snPCR ^b	PCR	snPCR
Animal	Collection date	Gender	City	BoHV-1	BoHV-5	BoHV-2	BoHV-4	OvHV-2
01	2/17/05	Female	Dom Pedrito	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
02	2/17/05	Female	Hulha Negra	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
03	2/17/05	Female	Garruchos	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
04	2/17/05	Female	Arroio Grande	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
05	2/17/05	Male	Alegrete	ia ^c	ia ^c	(-)	(-)	(-)
06	2/23/05	Female	Formigueiro	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
07	2/23/05	Female	Dom Pedrito	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
08	2/23/05	Female	Aceguá	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
09	2/23/05	Female	Aceguá	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	2/23/05	Female	Palmares do Sul	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
11	3/2/05	Female	Arroio Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
12	3/2/05	Female	Santana do Livramento	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
13	3/2/05	Female	Santana do Livramento	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
14	3/2/05	Female	Quaraí	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
15	3/2/05	Female	Hulha Negra	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	3/2/05	Female	Arroio Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
17	3/2/05	Female	Arroio Grande	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	3/2/05	Female	Dom Pedrito	ia ^c	ia ^c	(-)	(-)	(-)
19	3/16/05	Female	Palmares do Sul	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	3/16/05	Female	Itaqui	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	3/16/05	Female	Palmares do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
22	3/16/05	Female	Camaquã	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
23	3/16/05	Female	Itaqui	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
24	3/16/05	Female	Itaqui	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
25	7/19/05	Male	Cerrito	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
26	7/19/05	Male	Cerrito	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
27	7/19/05	Female	Bagé	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
28	7/19/05	Female	Jari	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
29	7/19/05	Female	Quaraí	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
30	7/19/05	Female	Espumoso	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	7/19/05	Female	Espumoso	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
32	7/20/05	Male	Jaguarão	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
33	7/20/05	Male	Piratini	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	7/20/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
35	7/20/05	Female	Júlio de Castilhos	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
36	7/20/05	Female	Piratini	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
37	7/20/05	Female	Piratini	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
38	7/20/05	Female	Piratini	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
39	7/20/05	Female	Piratini	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
40	7/20/05	Female	Arroio Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
41	7/21/05	Male	Tupanciretã	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
42	7/21/05	Male	Tupanciretã	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
43	7/21/05	Male	Arroio Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
44	7/21/05	Male	Arroio Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
45	7/21/05	Female	Santa Vitoria do Palmar	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Data collection of trigeminal ganglia				nPCR ^a		snPCR ^b	PCR	snPCR
46	7/21/05	Male	Arambaré	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
47	7/21/05	Male	Arambaré	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
48	7/21/05	Male	Aceguá	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
49	7/21/05	Male	Aceguá	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
50	7/21/05	Male	Jaguarão	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
51	7/21/05	Male	Aceguá	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
52	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
53	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
54	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
55	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
56	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
57	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
58	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
59	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
60	8/30/05	Female	Turuçu	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
61	8/30/05	Female	Formigueiro	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
62	9/6/05	Female	Júlio de Castilhos	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
63	9/6/05	Female	Júlio de Castilhos	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
64	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
65	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
66	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
67	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
68	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
69	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
70	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
71	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
72	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
73	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
74	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
75	10/26/05	Female	Cachoeira do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
76	10/27/05	Male	Pedras Altas	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
77	10/27/05	Female	Caçapava do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
78	10/27/05	Female	Caçapava do Sul	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
79	10/27/05	Female	Tapes	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
80	10/27/05	Female	Tapes	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
81	10/27/05	Female	Tapes	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
82	10/27/05	Female	Tapes	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
83	10/27/05	Female	Tapes	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
84	10/27/05	Female	Tapes	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
85	10/27/05	Female	Tapes	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
86	10/27/05	Female	Tapes	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
87	10/27/05	Female	Palmares do Sul	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
88	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
89	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
90	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
91	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
92	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
93	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
94	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
95	11/1/05	Female	Pinhal Grande	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
96	11/1/05	Male	Pinhal Grande	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

Data collection of trigeminal ganglia				nPCR ^a		snPCR ^b	PCR	snPCR
97	11/1/05	Female	Caçapava do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
98	11/1/05	Female	Caçapava do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
99	11/1/05	Female	Caçapava do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
100	11/11/05	Female	Lavras do Sul	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

447
448
449
450
451
452

a. nested PCR, data collected from study of Campos et al. (2009)

b. semi nested PCR

c. ia = inhibited amplification (these samples were again subjected to DNA extraction prior to testing for the presence of BoHV-2, 4 and OvHV-2)

453

4 – CAPÍTULO 2

4.1 - Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine

Author's personal copy

Veterinary Microbiology 148 (2011) 18–26



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Research article

Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine

F.S. Campos^{a,*}, D. Dezen^b, D.A. Antunes^a, H.F. Santos^b, T.S. Arantes^a, A. Cenci^b,
 F. Gomes^b, F.E.S. Lima^a, W.M.E.D. Brito^c, H.C.K. Filho^b, H.B.C.R. Batista^a, F.R. Spilki^d,
 A.C. Franco^a, F.A.M. Rijsewijk^a, P.M. Roehle^{a,b}

^a Virology Laboratory, Microbiology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^b HEPAGRO Animal Health – Institute for Veterinary Research “Desidério Pinheiro” (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^c Animal Virology Laboratory, DM-IPATSP, Federal University of Goiás (UFG), Campus Samambaia, Goiânia, CEP 74001-970, Goiás (GO), Brazil

^d Institute of Health Sciences, Molecular Microbiology Laboratory, Faevale University, Campus II, Rodovia RS-239, 2755, Novo Hamburgo, CEP 93352-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 25 July 2010

Accepted 6 August 2010

Keywords:

Bovine herpesvirus

BoHV-5

Inactivated vaccine

Recombinant vaccine

Encephalitis

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is the causative agent of bovine herpetic encephalitis. In countries where BoHV-5 is prevalent, attempts to vaccinate cattle to prevent clinical signs from BoHV-5-induced disease have relied essentially on vaccination with BoHV-1 vaccines. However, such practice has been shown not to confer full protection to BoHV-5 challenge. In the present study, an inactivated, oil adjuvanted vaccine prepared with a recombinant BoHV-5 from which the genes coding for glycoprotein 1 (g₁), glycoprotein E (g_E) and membrane protein US9 were deleted (BoHV-5 g₁/g_E/US9⁻), was evaluated in cattle in a vaccination/challenge experiment. The vaccine was prepared from a virus suspension containing a pre-inactivation antigenic mass equivalent to 10^{7.65} TCID₅₀/dose. Three mL of the inactivated vaccine were administered subcutaneously to eight calves serologically negative for BoHV-5 (vaccinated group). Four other calves were mock-vaccinated with an equivalent preparation without viral antigens (control group). Both groups were boosted 28 days later. Neither clinical signs of disease nor adverse effects were observed during or after vaccination. A specific serological response, revealed by the development of neutralizing antibodies, was detected in all vaccinated animals after the first dose of vaccine, whereas control animals remained seronegative. Calves were subsequently challenged on day 77 post-vaccination (pv) with 10^{9.25} TCID₅₀ of the wild-type BoHV-5 (parental strain EV188/95). After challenge, vaccinated cattle displayed mild signs of respiratory disease, whereas the control group developed respiratory disease and severe encephalitis, which led to culling of 2/4 calves. Searches for viral DNA in the central nervous system (CNS) of vaccinated calves indicated that wild-type BoHV-5 did not replicate, whereas in CNS tissues of calves on the control group, viral DNA was widely distributed. BoHV-5 shedding in nasal secretions was significantly lower in vaccinated calves than in the control group on days 2, 3, 4 and 6 post-challenge (pc). In addition, the duration of virus shedding was significantly shorter in the vaccinated (7 days) than in controls (12 days). Attempts to reactivate latent infection by administration of dexamethasone at 147 days pv led to recrudescence of mild signs of respiratory disease in both vaccinated and control groups. Infectious virus shedding in nasal secretions was

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 3655; fax: +55 51 3308 4111.
 E-mail address: camposvet@gmail.com (F.S. Campos).

detected at reactivation and was significantly lower in vaccinated cattle than in controls on days 11–13 post-reactivation (pr). It is concluded that the inactivated vaccine prepared with the BoHV-5 gI/gE/US9⁻ recombinant was capable of conferring protection to encephalitis when vaccinated cattle were challenged with a large infectious dose of the parental wild type BoHV-5. However, it did not avoid the establishment of latency nor impeded dexamethasone-induced reactivation of the virus, despite a significant reduction in virus shedding after challenge and at reactivation on vaccinated calves.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine encephalitis herpesvirus or bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a member of the order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* (Davison et al., 2009). BoHV-5 is closely related to bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) (Del Médico Zajac et al., 2010).

Cases of BoHV-5-associated encephalitis have been reported worldwide: in Australia (French, 1962; Smith et al., 1995), Europe (Moretti et al., 1964; Bartha et al., 1969; Magyar et al., 1989), North America (Barenfus et al., 1963; Gough and James, 1975; D'Offay et al., 1993; Ely et al., 1996; Ashbaugh et al., 1997), and particularly in South America (Carrillo et al., 1983; Schudel et al., 1986; Riet-Correa et al., 1989; Pidone et al., 1999). In Brazil, outbreaks of BoHV-5 encephalitis seem to be increasing in number (Weiblen et al., 1989; Salvador et al., 1998; Spilki et al., 2003; Silva et al., 2007a; Rissi and Pierezan, 2008). However, determination of BoHV-5 prevalence rates has been hampered initially by the unavailability of methods capable of differentiating BoHV-1 and BoHV-5 infections; secondly, by the lack of a serological method capable of distinguishing between the widely cross-reactive BoHV-1 and BoHV-5 antibodies (Varela et al., 2010; Holz et al., 2009). Moreover, dual BoHV-1 and BoHV-5 infections make such distinction yet more complicated (Campos et al., 2009). Despite these setbacks, in a study carried out in southern Brazil, prevalence of BoHV-5 infections (and co-infections) was in fact higher than the prevalence of BoHV-1 infections (Campos et al., 2009). This suggests that BoHV-5 is widely disseminated in cattle in Brazil, and highlights the need for efficacious BoHV-5 vaccines.

In countries where BoHV5 is prevalent, attempts to vaccinate cattle to prevent clinical signs from BoHV-5-induced disease have relied essentially on vaccination with BoHV-1 vaccines (Petzhold et al., 2001). A highly efficacious, experimental gE-negative BoHV-1 vaccine was unable to confer full protection to BoHV-5 infection and had no effect on nasal virus shedding or on the development of encephalitic lesions (Spilki et al., 2004; Silva et al., 2006).

In search for more efficacious vaccines, a recombinant virus was constructed, based on a Brazilian BoHV-5 isolate, from which the genes coding for glycoprotein 1 (gI), glycoprotein E (gE) and the membrane protein US9 were deleted (Franco et al., 2007). In pathogenicity experiments in calves we demonstrated that such recombinant was still capable of replicating in cells from the basal portions of the central nervous system (Hübner et al., 2005). Therefore,

the possibility of using such a recombinant as vaccine virus for an attenuated vaccine was hampered. In addition, safety issues may hinder live attenuated virus vaccines in certain countries. From this point of view, inactivated virus vaccines are safer and may compare favorably to live attenuated vaccines (Kaashoek et al., 1995).

In view of that, in the present study, an inactivated vaccine was prepared with the BoHV-5 gI/gE/US9⁻ recombinant and evaluated in vaccination/challenge experiments, in order to determine whether such vaccine would confer protection to BoHV-5-induced clinical disease. Calves were vaccinated and challenged with a virulent BoHV-5 wild type strain. Subsequently, vaccinated calves were submitted to corticosteroid administration to examine the effect of vaccination on latency.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

The cell lineage CRIB (Flores and Donis, 1995), a bovine diarrhea virus-resistant clone derived from Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) was used for virus multiplication, quantification and virus isolation. The cells were maintained in Eagle's minimal essential medium (E-MEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell), 10 µg/mL enrofloxacin (Baytril[®], Bayer), 50 µg/mL gentamicin (Gentamax[®], Marcolab), and 2 µg/mL amphotericin B (Cristália).

The wild type BoHV-5 strain EVI 88/95 was isolated in 1995 from an outbreak of meningoencephalitis in Mato Grosso do Sul, Brazil, and previously characterized in our laboratory (Roehe et al., 1997; Souza et al., 2002; Esteves et al., 2008). The virus was used for the construction of the recombinant (BoHV-5 gI/gE/US9⁻) as described by Franco et al. (2007). The EVI 88/95 virus was also used as the challenge virus.

2.2. Experimental design

Twelve calves of mixed European breeds, male and female, 4–6 months old, serologically negative for BoHV-5 and BoHV-1 (as determined by serum neutralization tests), were used in the experiment. Eight calves were vaccinated with the recombinant virus BoHV-5 gI/gE/US9⁻ (vaccinated group; VG; see below). Four other calves were mock-vaccinated with sterile vaccine diluents with adjuvant (control group; CG). Both groups were boosted 28 days later. Forty-nine days after the second vaccine dose (on day 77 pv), both vaccinated and control calves were challenged

Author's personal copy

20

F.S. Campos et al./ *Veterinary Microbiology* 148 (2011) 18–26

with the wild type BoHV-5 strain EVI 88/95 by intranasal inoculation and monitored for 14 days. Seventy days later (on day 147 pv), all calves under study were subjected to dexamethasone administration in attempting to reactivate latent viruses and to observe the effect of such administration on vaccinated and control calves.

2.3. Vaccine preparation

CRIB cells were multiplied and 16–24 h after seeding when monolayers were nearly confluent, the medium was removed and cells inoculated with the recombinant virus (BoHV-5 gl/gE/US9) at a multiplicity of infection equal to 1. After 1 h at 37 °C, the inoculum was removed, the bottles replenished with E-MEM without fetal calf serum and incubated for 16–24 h at 37 °C. When cytopathic effect was evident in 90% of the monolayers, bottles were shaken to fully detach cells, frozen and stored at –70 °C until use. After thawing, infectious titers of the supernatants of infected cultures were determined following standard procedures (Reed and Muench, 1938). The viral suspension was inactivated with binary ethylenimine (BEI) as described previously (Bahnmann, 1975). The vaccine was prepared in a 50% low viscosity water-in-oil-in-water emulsion with oil (Montanide™ ISA 206) content and subjected to usual controls, as recommended (Petzhold et al., 2001). Each 3 mL dose of the vaccine contained an antigenic mass equivalent to $10^{7.69}$ 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀). The inactivation process was evaluated by titration of the inactivated suspension in 96-well cell culture plates and by the inoculation of serial 10-fold dilutions of the suspension in 25 cm² cell culture flasks. As positive controls, aliquots of the viral suspension previous to inactivation were included in the tests. The vaccine was stored at 4 °C until use.

2.4. Animal inoculation

Eight calves were vaccinated (day 0) subcutaneously in the neck region with a 3 mL dose of the vaccine. Four other calves were mock-vaccinated with 3 mL of the oil-in-water emulsion without antigen. Both groups were boosted 28 days later using the same administration protocol. Clinical observations and collection of specimens for virus isolation are described below.

2.5. Challenge

On day 77 post the first vaccination, all calves were challenged with $10^{9.25}$ TCID₅₀ of the wild-type BoHV-5 strain EVI 88/95, administered intranasally in 10 mL (5 mL into each nostril). Seventy days after challenge (on day 147 pv), all calves were subjected to corticosteroid administration in attempting to reactivate latent infections. Dexamethasone (0.2 mg per kg of body weight) was administered intravenously for 5 consecutive days as described (Silva et al., 2006). Calves were kept under observation and samples collected as below. All procedures involving animal care, and handling were performed under veterinary supervision and according to the recommendations of the Brazilian Law (No 11.794,

2008) (Marques et al., 2009). The project was approved by the Ethics Commission of the Institute for Veterinary Research "Desidério Finamor" under protocol number 02/2009.

2.6. Clinical examination

Clinical examinations were performed daily from day 12 prior to vaccination up to day 14 pc. The same examination protocol was followed from day 12 prior to dexamethasone administration (reactivation) up to day 14 pr. Signs recorded were rectal temperature (fever was defined as a rectal temperature of more than 39.5 °C), respiratory rate, coughing, congestion of the nasal mucosa, conjunctivitis, ocular and nasal discharges, lesions on the nasal and oral mucosa and changes in behavior and appetite. The respiratory clinical scoring method was adapted from Collie (1992), with modifications based on our previous experience with BoHV-1 experimental inoculations (Franco et al., 2002). Thus, scores were determined by attributing different weights to different signs of disease. Mean clinical scores were calculated daily for each group. Neurological symptoms were detected by the observation of depression, circling, tremors, bruxism and incoordination. Seventy days later, during reactivation attempts, clinical and virological examinations were performed as described by Franco et al. (2002).

2.7. Virological examination

Samples for virological examination were collected daily from days 1 to 14 pc, as well as on days 1–14 pr. Nasal swabs were eluted in 2 mL of E-MEM supplemented with 10 times the usual concentration of antimicrobials and incubated for one hour at 4 °C. The samples were vigorously shaken, the swabs removed, drained, the medium clarified by low speed centrifugation and stored at –70 °C. Virus titrations were performed on 96-well microtitre plates. Infectious titers were calculated and expressed as log₁₀ TCID₅₀ per 50 μL using the method of Reed and Muench (1938).

2.8. Virus neutralization tests (VNTs)

Serum samples were collected by jugular venipuncture at weekly intervals from the first vaccination (day 0) onwards till the end of the experiment (on day 161). VNTs were performed according to the protocol recommended by OIE (Kramps, 2008). Sera were tested in serial twofold dilutions in a standard BoHV-5 neutralizing antibody test (VNTs). Tests were carried out in duplicate in 96-well microplates, with 50 μL per well of each serum dilution against 100 TCID₅₀ of the BoHV-5 strain EVI 88/95. After a 24 h incubation at 37 °C in a 5% CO₂ incubator (Forma Scientific), 100 μL of a cell suspension containing 3×10^4 cells were added to wells and the plates further incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Up to 4 days after the start of the VNTs the cells were examined for the presence of the characteristic BoHV-5 cytopathic effect. Neutralizing antibody titers were calculated by the method of Reed and Muench (1938).

2.9. Necropsied and histopathology

Tissues from necropsied animals collected for histological examination were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 6 μm and stained with haematoxylin-eosin following routine protocols (Prophet et al., 1992). The brain sections were collected following the protocol described by Vogel et al. (2003).

2.10. Virus isolation from tissues

Tissues from necropsied animals collected were submitted to virus isolation. The tissues were homogenized with sterile sand at 10% (w/v) with E-MEM supplemented with 10-fold usual concentration of antibiotics and clarified at 2500 $\times g$ for 20 min at 4 °C. Volumes of 200 μL of each supernatant were inoculated onto CRIB monolayers prepared on 96-well plates in quadruplicate (50 μL /well). Infected cultures were checked for the presence of virus for 7 days. All negative cultures were frozen at -70 °C, thawed and passaged once more on fresh CRIB monolayers. When viral cytopathic effect was detected, 10-fold dilutions of the original suspensions were titrated on CRIB cells. Recovered viruses were titrated and its identity confirmed by a polymerase chain reaction (PCR) as described below. Infectious titers were determined, calculated and expressed as \log_{10} TCID₅₀ per 50 μL after 72 h of incubation at 37 °C as previously described.

2.11. PCR amplification

Detection of viral DNA from tissues was performed by PCR. At first, samples were submitted to the extraction of total DNA following a standard phenol (Invitrogen) extraction and ethanol (Synth) precipitation (Sambrook and Russell, 2001), later the purified DNA was dissolved in 200 μL TE (10 mM Tris pH 7.4; 1 mM EDTA pH 8.0). The primers used in the PCR assay anneal to a region of glycoprotein C (gC) shared by both BoHV-1 and BoHV-5 (Esteves et al., 2008; Campos et al., 2009). To identify false positive results, negative control reactions were added to each set of four PCRs and an internal control was added to each reaction. This protocol was also applied to confirm the identity of isolated viruses from tissues.

2.12. Statistical analysis

Analysis of variance for repeated measures (ANOVA) was performed using mixed procedure in SAS v. 9.2 and the multiple comparisons were performed using the LSMeans Proc with Tukey-Kramer Adjustment. The graphs were performed with Data Analysis Supplement for Excel™ (Office System 2007 for Windows™, Microsoft Corp., Seattle, USA). Differences of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Vaccination

No significant clinical signs or adverse effects were seen during or after vaccination. A post-vaccination granulo-

matous reaction was detected in 50% of the inoculated calves (4/8 on VG and 2/4 on CG). Apart from that, all animals were clinically healthy and no signs of respiratory disease were observed up to challenge on day 77 pv.

3.2. Clinical and virological findings pc

Between days 3 and 11 pc, vaccinated calves displayed mild clinical signs of respiratory disease (mild nasal lesions, nasal discharge, sneezing, coughing). Pyrexia was observed among vaccinated calves only on days 3 and 4 pc (Fig. 1a). All animals on VG shed BoHV-5 in nasal secretions from days 1 to 7 pc. The virus titers ranged from $10^{0.53}$ to $10^{3.55}$ TCID₅₀/mL (Fig. 2a). BoHV-5 shedding after challenge in nasal secretions was significantly lower ($p < 0.05$) in vaccinated calves than in control calves on days 2, 3, 4 and 6 pc (Fig. 2a). The CG calves developed clinical signs of respiratory disease during the pc period, albeit much more intense than those on VG. Additionally, 2/4 calves on CG developed severe clinical neurological signs of illness which started on day 10 pc (calf no. 9) and 12 (calf no. 12). Due to the severity of the clinical signs, these calves were euthanized on humanitarian grounds. The intensity and the range of neurological signs were different between calves. In calf no. 9 the signs were characterized by muscle trembling, ataxia followed by lateral recumbence, paddling and opisthotonus. In calf no. 12 a progressive weight loss, difficulties of standing and walking, circling,

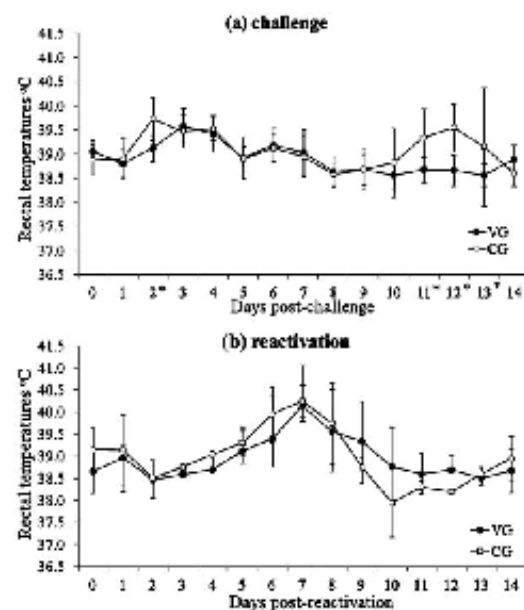


Fig. 1. Mean rectal temperatures (°C) (a) after challenge and (b) during reactivation of vaccinated (vaccinated group, VG) with BoHV-5 gI/gE/US9⁺ inactivated (black circles) and mock-vaccinated (control group, CG) calves (empty squares). Vertical bars = standard deviation. *Mean rectal temperatures was significantly differed ($p < 0.05$) on day 2, 11, 12 and 13 during challenge. During the reactivation was no significant difference between the mean rectal temperatures of groups.

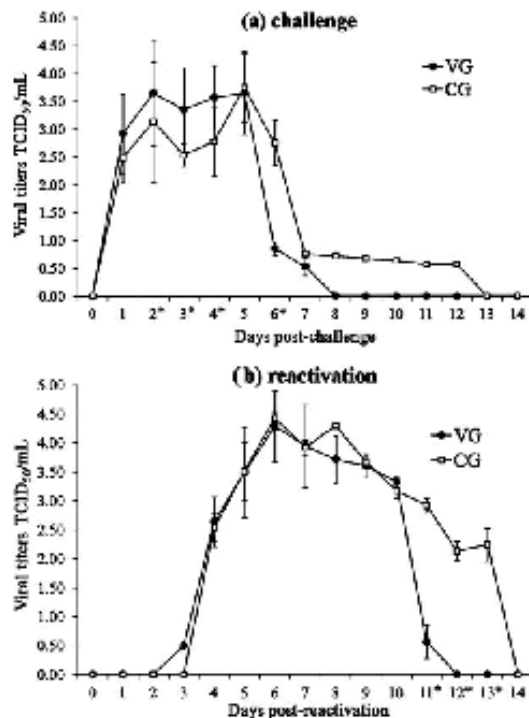


Fig. 2. Nasal virus shedding: (a) after challenge with wild type virus (EV1 88/95); (b) during reactivation with dexamethasone administration. Infectious virus titers expressed in \log_{10} of 50% tissue culture infectious doses per mL (TCID₅₀/mL). Black circles: vaccinated calves (vaccinated group, VG); empty squares: mock-vaccinated calves (control group, CG). Vertical bars = standard deviation. *Mean nasal virus shedding was significantly differed ($p < 0.05$) between of groups on day 2, 3, 4 and 6 during challenge and on day 11, 12 and 13 during the reactivation.

disorientation and blindness were observed. In all of the CG calves, on day 2 pc, the rectal temperatures started to rise beyond of 39.5 °C. Fever was recorded from days 2 to 4 and on day 12 (Fig. 1a). Virus shedding was detected in nasal secretions from day 1 to 12 pc on all CG calves. However, the period of viral excretion was longer on CG than on calves from VG. Infectious virus titers of the CG calves ranged from $10^{0.58}$ to $10^{4.80}$ TCID₅₀/mL in nasal secretions (Fig. 2a).

3.3. Clinical and virological findings following reactivation attempts

Calves were treated with dexamethasone to determine if inactivated BoHV-5 gI/gE/US9⁻ vaccine influenced reactivation of latent virus. All animals were clinically normal before dexamethasone treatment. After administration of the corticosteroid, calves from both VG and CG developed signs of respiratory disease similar to those observed on the pc period. However, such signs started on day 3 pr and remained detectable until the end of reactivation. Calves on VG were pyrexia on days 7 and 8 pr, whereas on the CG, on days 6–8 pr (Fig. 1b). The

increase in rectal temperatures correlated with virus shedding (Figs. 1b and 2b). BoHV-5 shedding was detected in nasal secretions of all CG calves from days 4 to 13 pr ($10^{2.13}$ to $10^{4.55}$ TCID₅₀/mL, Fig. 2b), and on VG calves from days 3 to 11 pr ($10^{0.50}$ to $10^{5.30}$ TCID₅₀/mL, Fig. 2b). Infectious virus shedding in nasal secretions was significantly lower ($p < 0.05$) between groups after reactivation on day 11–13 (Fig. 2b). In addition, during reactivation, no signs of neurological disease were noticed in both groups.

3.4. Neutralizing antibody responses

None of the calves had detectable BoHV-5 neutralizing antibodies previous to the experiments. Calves on CG remained seronegative to BoHV-5 until challenge. After the first vaccination, the calves nos. 2 and 6 (VG) had detectable neutralizing antibodies to BoHV-5 (on day 7 pv). On day 21, all calves seroconverted to BoHV-5. The mean neutralizing antibody titer detected after the second dose of vaccine in all vaccinated animals increased in comparison to the mean titer obtained after the first dose of vaccine. After challenge, again a boost in BoHV-5 neutralizing antibody titers was detected in all VG calves, which produced higher antibody titers after challenge than the CG calves (Fig. 3). On days 84–119 pv and on day 161 pv the mean neutralizing antibody titer was significantly higher on VG than on CG ($p < 0.05$; Fig. 3).

3.5. Necropsy and histopathology

Two CG calves were severely affected and displayed evident signs of neurological disease after challenge. These were euthanized *in extremis*, one on day 14 pc (calf no. 9) and another on day 16 pc (calf no. 12). On day 9 pr, one vaccinated calf (no. 6) was necropsied. Post-mortem examinations revealed that only the necropsied calves on CG had typical BoHV-5 lesions in brain tissues, with foci of malacia and sinking areas on the frontal, parietal and temporal lobes. Mononuclear meningoencephalitis with perivascular infiltrates was consistent microscopical findings. However, typical BoHV-5 lesions in the brain the calf no. 6 were not detected. Instead, the lung parenchyma revealed congestion, intra-alveolar and interstitial edema, fibrin deposition and extensive hemorrhages.

3.6. Virus isolation

Infectious virus was recovered from all tissues of CG calf no. 9, euthanized *in extremis* on day 14 pc (Table 1). From the CG calf no. 12, euthanized *in extremis* on day 16 pc, infectious virus was recovered from tonsils, adrenal glands, kidneys and all brain sections (Table 1). On the other hand, infectious virus was not recovered from the vaccinated calf (no. 6), euthanized *in extremis* on day 9 pr (Table 1).

3.7. PCR amplification

The PCR assay was applied on the tissues of CG calves with neurological signs (calves nos. 9 and 12) and the vaccinated calf (no. 6) that died during the reactivation

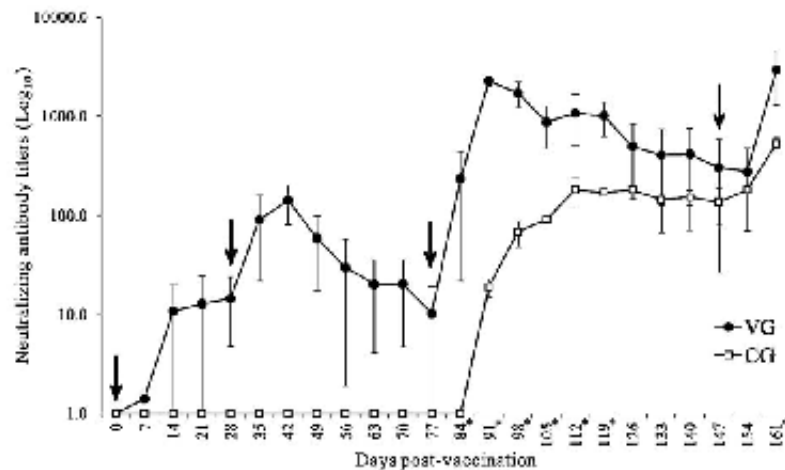


Fig. 3. Neutralizing antibody titers in sera from calves (geometric mean titers in each group) after immunization with an inactivated BoHV-5 gI/gE/US9⁻ vaccine, challenge with wild type virus (EM 88/95) and during reactivation attempts. Black circles: vaccinated group (VG) calves; empty squares: control group (CG) calves. Arrows points to date of immunization (day 0 first dose and day 28 second dose); challenge (77 day post-vaccination) and date of the beginning of dexamethasone administration (147 days post-vaccination), respectively. Titers expressed as \log_{10} of the reciprocal of the neutralizing antibody titers. *On days 84–119 and on day 161 the mean antibody titer differed means ($p < 0.05$) between groups.

Table 1

Virus isolation in tissues from euthanized BoHV-5 infected calves that developed acute meningoencephalitis (control group calves, no. 9 and no. 12) and one vaccinated group calf (no. 6) that died following reactivation.

Calves	Adrenal glands	Dorsal root ganglia	Kidneys	Liver	Lung	Lymph nodes ^a	Spleen	Tonsil	Tracheal mucosa	Trigeminal ganglia	Brain section ^b											
											1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
6	– ^c	ne ^d	–	–	–	–	–	ne	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	+ ^e	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Lymph nodes: sub-mandibular, parotid, retropharyngeal, tracheobronchial and pulmonary.

^b Brain sections from both cerebral hemispheres. Refer to methods for details.

^c Negative.

^d Not examined.

^e Positive.

Table 2

PCR from post-mortem samples in BoHV-5 infected calves euthanized which developed acute meningoencephalitis (control group calves, no. 9 and no. 12) and one vaccinated group calf (no. 6) that died during reactivation.

Calves	Adrenal glands	Dorsal root ganglia	Kidneys	Liver	Lung	Lymph nodes ^a	Spleen	Tonsil	Tracheal mucosa	Trigeminal ganglia	Brain sections ^b											
											1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
6	– ^c	ne ^d	–	–	–	–	–	ne	–	+ ^e	–	–	–	–	–	+	+	–	+	–	–	
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Lymph nodes: sub-mandibular, parotid, retropharyngeal, tracheobronchial and pulmonary.

^b Brain sections from both cerebral hemispheres. Refer to methods for details.

^c Negative.

^d Not examined.

^e Positive.

period. PCR assay was performed with a series of brain sections. Most of the samples from infected calves which died from meningoencephalitis during primary infection had detectable BoHV-5 genomes in different parts of the brain (Table 2). In contrast, vaccinated calf no. 6 had BoHV-5 DNA only in the trigeminal ganglia and three regions of the brain (thalamus, midbrain and olfactory cortex; Table 2).

4. Discussion

In view of the high degree of antigenic relatedness between BoHV-1 and BoHV-5, the need for a vaccine with BoHV-5-specific antigens still remains. It has been speculated that BoHV-5 infections would not occur in countries where BoHV-1 vaccination is massively employed (Ackemann and Engels, 2006). However,

despite the apparent epidemiological evidence, no experiments have been made to support such hypothesis. Vaccination to BoHV-1 has been employed in attempting to control outbreaks of BoHV-5 encephalitis (Silva et al., 2006, 2007b). In a previous study, we have demonstrated that an experimental gE-negative BoHV-1 vaccine would not confer satisfactory protection to BoHV-5 challenge (Silva et al., 2006). This highlights the need for efficacious BoHV-5 vaccines. Currently, in Brazil, some bovine herpesvirus vaccines include BoHV-5 antigens in its preparations (SINDAM, 2010). Yet, to our knowledge, data on the efficacy of such vaccines have not been made publically available. In this study, a vaccination/challenge experiment was conducted with an inactivated vaccine prepared with a recombinant BoHV-5 (gI/gE/US9⁻). Vaccinated and control groups were monitored for 14 days prior to vaccine administration and then from vaccination (day 0 and 28) to challenge (on day 77) up to reactivation attempts (on day 147–161). The vaccine was safe for use in calves since it did not cause any relevant adverse effects on inoculated animals. More important, it was shown to confer protection to encephalitis in cattle upon challenge with a high dosage of virulent BoHV-5. None of the vaccinated calves showed any clinical signs of encephalitis. In contrast, two of four non-vaccinated calves infected with BoHV-5 displayed evident signs of neurological disease. Moreover, vaccinated calves shed wild type virus in nasal secretions for a shorter period of time than did mock-vaccinated calves. Thus, the vaccine was also efficacious in reducing the duration of nasal virus shedding in vaccinated calves.

Hübner et al. (2005) examined the effect of the intranasal inoculation of the infectious, triple BoHV-5 deletion mutant (BoHV-5 gI/gE/US9⁻) in calves. Those authors observed some degree of neural damage in the CNS of inoculated calves; such undesirable effect would compromise its potential use as an attenuated vaccine. On the other hand, as shown here, the inactivated oil adjuvanted vaccine prepared with the same recombinant caused no damage to the CNS of vaccinated animals. This was of course expected since no infectious virus was present in the inactivated vaccine preparation.

Despite protecting from encephalitis, the vaccine was not capable of preventing virus infection upon challenge, since the challenge virus was still able to replicate in nasal tissues at the site of inoculation, as detected by virus isolation. Therefore, here, as reported on a number of occasions for other herpesvirus vaccines, vaccination did not prevent infection, though conferring protection to the major clinical signs of disease (Cascio et al., 1999; Meyer et al., 2001; Hübner et al., 2005; Del Médico Zajac et al., 2006; Silva et al., 2006).

After dexamethasone administration, the vaccinated calf no. 6 (VG) was euthanized on day 10 pr on humanitarian grounds; the calf displayed clinical signs which were consistent with a secondary pulmonary infection, probably related to the immunosuppressive effects of the corticosteroid administration. No signs of neurological disease were observed on this calf. To rule out encephalitis by BoHV-5 as the cause of illness in this animal, we examined in detail tissues samples obtained during necropsy. Virus

isolation attempts from post-mortem tissue samples were negative. PCR tests in search for BoHV-5 DNA were also negative, except in the trigeminal ganglion and three brain regions (thalamus, midbrain and olfactory cortex) in the CNS. The presence of viral DNA in these regions, the absence of infectious virus in tissues, plus the absence of detectable clinical signs and lesions in brain tissues of this calf confirmed that it was latently infected with the challenge virus. Reactivation in fact took place, as detected by the presence of infectious virus in nasal secretions; however, infectious virus apparently did not spread to other brain tissues. This is interesting since it shows that BoHV-5 may also be reactivated at peripheral sites and produce infectious virus and not necessarily lead to encephalitis – despite the virus' recognized neurovirulence.

The vaccine induced high titers of neutralizing antibodies. After challenge, vaccinated animals responded with a significant secondary response, indicating that it was highly effective in inducing neutralizing antibodies and in stimulating memory cells. These results were similar to those obtained in other vaccination experiments using BoHV-5 vaccines (Hübner et al., 2005; Cascio et al., 1999). In addition, the inactivated vaccine induced higher antibody titers than, most likely due to the addition of the adjuvant.

The data presented here show that the inactivated, oil adjuvanted vaccine prepared with the BoHV-5 gI/gE/US9⁻ recombinant was safe and protected vaccinated calves against encephalitis when challenged with a high infectious dose ($10^{9.25}$ TCID₅₀) of virulent wild type BoHV-5. The vaccine did not prevent infection, but vaccinated calves displayed only mild respiratory clinical signs after such a massive infectious virus dosage. Such vaccine preparation seems promising and must be evaluated further in field studies in order to determine its applicability to control BoHV-5 disease in the field. Moreover, the recombinant BoHV-5 tested here in an inactivated formulation has the potential to be used as a marker vaccine, which would allow the serological differentiation of vaccinated and naturally infected animals, crucial to an efficient control of infections in animal populations. It may be argued that the absence of gE in the vaccine might make it less prone to induce protection to encephalitis. There is strong evidence highlighting the importance of gE in neurovirulence (Al-Mubarak et al., 2004; Meyer et al., 1996). Actually, the three proteins not coded by the BoHV-5 gI/gE/US9⁻ evaluated here seem to play some role in neurovirulence, as pointed out previously (Hübner et al., 2005). Nonetheless, despite the absence of such genes, the inactivated recombinant was still able to induce protection to neurovirulence. Thus, it is very likely that other proteins beyond gE, gI and US9 might also be involved in neuropathogenicity. In a rabbit model, this triple recombinant was also shown to retain some neuropathogenicity (Silva et al., 2009). In fact, the removal of any residual neuropathogenicity – clearly unacceptable in a vaccine – was one of the main reasons for testing the inactivated preparation described here. Nevertheless, the reason why such a severely deleted recombinant was still able to protect cattle against neurological disease remains

unknown. These findings provide more evidence to support the involvement of other mechanisms than those already explored to justify neurovirulence. In view of recent previous reports (Gabev et al., 2010), it might also be suggested that gD might be the main immunological target of the recombinant vaccine here reported. This, however, can merely be hypothesized since such demonstration was beyond the scope of the present study.

5. Conclusions

The efficacy of BoHV-5 gJ/gE/US9⁻ recombinant was evaluated as an inactivated, oil adjuvanted vaccine in vaccination/challenge experiments in cattle. After challenge with the parental virus strain (BoHV-5 EVI 88/95), vaccinated calves were protected from encephalitis. Virus shedding was significantly shortened in vaccinated calves (7 days) when compared to controls (12 days). Dexamethasone administration at 147 days post-vaccination led to recrudescence of mild respiratory clinical signs in both vaccinated and control groups, though nasal virus shedding differ significantly between groups at reactivation. In view of its immunogenicity and protective effect upon challenge with a virulent BoHV-5, it is concluded that the recombinant vaccine evaluated here is suitable to be further evaluated in larger field experiments.

Acknowledgements

The authors would like to thank the collaborators of the Virology Laboratories of UFRRGS and Fepagro Animal Health – IPVDF. The authors also thank Dr. D. Driemeier for his help with the histopathological examination of specimens. F.S. Campos is a doctorate student at the Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária (PPGCV/UFRRGS/Brazil), grantees of CAPES. P.M. Roehe and F. R. Spilki are CNPq research fellows. Work supported by CNPq and CAPES.

References

- Ackermann, M., Engels, M., 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 113, 293–302.
- Al-Mubarak, A., Zhou, Y., Chowdhury, S.I., 2004. A glycine-rich Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) gE-specific epitope within the ectodomain is important for BHV-5 neurovirulence. *J. Virol.* 78, 4806–4816.
- Ashbaugh, K., Thompson, K., Bellnap, E., Schultheiss, P., Chowdhury, S., Collins, J., 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 387–394.
- Bahnmann, H.G., 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47, 47–56.
- Barenfus, M., DeLiquadri, C., McIntyre, R., Schroeder, R., 1963. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 143, 725–728.
- Bartha, A., Hajdu, G., Aldasy, P., Paczolay, G., 1969. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 19, 145–151.
- Campos, F.S., Franco, A.C., Hübner, S.O., Oliveira, M.T., Silva, A.D., Esteves, P.A., Roehe, P.M., Rijsewijk, F.A., 2009. High prevalence of coinfections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.* 139, 67–73.
- Carrillo, B.J., Ambroggi, A., Schudel, A.A., Vazquez, M., Dahme, E., Pospischil, A., 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B* 30, 327–332.
- Cascio, K.E., Bellnap, E.B., Schultheiss, P.C., Ames, A.D., Collins, J.K., 1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 134–139.
- Collie, D.D., 1992. Pulmonary function changes and clinical findings associated with chronic respiratory disease in calves. *Br. Vet. J.* 148, 33–40.
- D'Offay, J.M., Mock, R.E., Fulton, R.W., 1993. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 54, 534–539.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177.
- Del Médico Zajac, M.P., Puntel, M., Zamorano, P., Sadir, A.M., Romera, S.A., 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 81, 327–334.
- Del Médico Zajac, M.P., Ladeifa, M.F., Kotsias, F., Muyllkens, B., Thiry, J., Thiry, E., Romera, S.A., 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *Br. Vet. J.* 184, 138–145.
- Ely, R.W., D'offay, J.M., Ruefer, A.H., Cash, C.Y., 1996. Bovine herpesvirus encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 487–492.
- Esteves, 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., 2008. 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 Res.* 131, 16–22.
- Flores, E.F., Donis, R., 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) due to a block in viral entry. *Virology* 208, 565–575.
- Franco, A.C., Spilki, F.R., Esteves, F.R., Lima, M., Weiblen, R., Flores, E.F., Rijsewijk, F.A.M., Roehe, P.M., 2002. A Brazilian glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. *Pesqui. Vet. Bras.* 22, 135–140.
- Franco, A.F., Hübner, S.O., Oliveira, A.P., Batista, H.B.C.R., Roehe, P.M., Rijsewijk, F.A.M., 2007. Construction and characterization of a Bovine herpesvirus 5 mutant with a deletion of the gI, gE and US9 genes. *Braz. J. Microbiol.* 38, 667–673.
- French, E.L., 1962. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust. Vet. J.* 38, 216–221.
- Gabev, E., Tobler, K., Abril, C., Hilbe, M., Sem, C., Franchini, M., Campadelli-Bume, G., Fraefel, C., Ackermann, M., 2010. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. *J. Virol.* 84, 5583–5593.
- Gough, A., James, D., 1975. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis. *Can. Vet. J.* 16, 313–314.
- Holz, C.L., Cibulski, 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., 2009. Prevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesqui. Vet. Bras.* 29, 767–773.
- Hübner, S.O., Oliveira, A.P., Franco, A.C., Esteves, P.A., Silva, A.D., Spilki, F.R., Rijsewijk, F.A.M., Roehe, P.M., 2005. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 187–196.
- Kaashoek, M.J., Moerman, A., Madic, J., Weerdmeester, K., Maris-Veldhuis, M., Rijsewijk, F.A.M., Oirschot, J.T., 1995. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* 13, 342–346.
- Kramps, J.A., 2008. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, OIE, World Organization for Animal Health, pp. 752–767, Chapter 2.4.13.
- Magyar, G., Benko, M., Harrach, B., Kucsner, L., Bartha, A., 1989. DNA restriction enzyme analysis of bovine herpesvirus 1 strain isolated from encephalitis in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 37, 349–352.
- Marques, R.G., Morales, M.M., Petrioiaru, A., 2009. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir. Bras.* 24, 69–74.
- Meyer, G., Lemaire, M., Lyaku, J., Pastoret, P.P., Thiry, E., 1996. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.* 51, 27–40.
- Meyer, G., Lemaire, M., Ros, C., Belak, K., Gabriel, A., Cassart, D., Coignoul, F., Belak, S., Thiry, E., 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.* 146, 633–652.

Author's personal copy

- Moretti, B., Orfei, Z., Mondino, G., Persechino, A., 1964. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. *Vet. Ital.* 15, 676–702.
- Petzhold, S.A., Reckziegel, P.E., Prado, J.A., Teixeira, J.C., Wald, V.B., Esteves, P.A., Spilki, F.R., Roehle, P.M., 2001. Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an inactivated vaccine to BHV-1. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38, 184–187.
- Pidone, C.I., Galosi, C.M., Echeverría, M.G., Nasetto, E.O., Etcheverrigaray, M.E., 1999. Restriction Endonuclease Analysis of BHV-1 and BHV-5 Strains Isolated in Argentina. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 46, 453–456.
- Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H., 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology (U.S.), American Registry of Pathology, Washington, DC.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- Riet-Correa, F., Vidor, T., Schild, A.L., Méndez, M.C., 1989. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causada por herpesvírus bovino-1. *Pesqui. Vet. Bras.* 9, 13–16.
- Rissi, D.R., Pierezan, F., Sáe Silva, M., Hores, E.F., Lombardo de Barros, C.S., 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diag. Invest.* 20, 346–349.
- Roehle, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, D.G., Rosa, J.C.A., 1997. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). *Pesqui. Vet. Bras.* 17, 41–44.
- Salvador, S.C., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Roehle, P.M., Osório, A.L.A., 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesqui. Vet. Bras.* 18, 75–82.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schudel, A.A., Carrillo, B.J., Wylex, R., Metzler, A.E., 1986. Infections of calves with antigenic variants of Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl. Veterinarmed.* B 33, 303–310.
- Silva, A.D., Spilki, F.R., Franco, A.C., Esteves, P.A., Hübner, S.O., Driemeier, D., Oliveira, A.P., Rijsewijk, F., Roehle, P.M., 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine* 24, 3313–3320.
- Silva, L.F., Weiblen, R., Flores, E.F., 2007b. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Cienc. Rural* 37, 1471–1474.
- Silva, M.S., Brum, M.C.S., Weiblen, R., Flores, E.F., 2007a. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987–2006). *Pesqui. Vet. Bras.* 27, 403–408.
- Silva, A.D., Franco, A.C., Esteves, P.A., Spilki, F.R., Roehle, P.M., 2009. Experimental infection of rabbits with a recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) gI, gE and US9-negative. *Pesqui. Vet. Bras.* 29, 913–918.
- SINDAM (Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal) 2010. CPSV (Compêndio de Produtos Veterinários). Pesquisa, Pesquisa produtos (Classe Terapêutica: Vacinas; Princípio ativo: Rinotraqueíte Infecciosa bovina). [Buscar. http://www.sindan.org.br](http://www.sindan.org.br) (accessed on April 8).
- Smith, G.A., Young, P.L., Reed, K.C., 1995. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Arch. Viro.* 140, 599–603.
- Souza, V.F., Melo, S.V., Esteves, P.A., Schmidt, C.S.R., Gonçalves, D., Schaefer, R., Silva, T.C., Almeida, R.S., Vicentini, F.K., Franco, A.C., Oliveira, E.A.S., Spilki, F.R., Weiblen, R., Flores, E.F., Lemos, R.A., Alfieri, A.A., Pituco, E.M., Roehle, P.M., 2002. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). *Pesqui. Vet. Bras.* 22, 13–18.
- Spilki, F.R., Franco, A.C., Teixeira, M.B., Esteves, P.A., Schaefer, R., Schmidt, E., Lemos, R.A., Roehle, P.M., 2003. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies 1. *Pesqui. Vet. Bras.* 23, 1–4.
- Spilki, F.R., Silva, A.D., Hübner, S., Esteves, P.A., Franco, A.C., Driemeier, D., Roehle, P.M., 2004. Partial Protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 247–250.
- Varela, A.P.M., Holz, C.I., Cibulski, S.P., Teixeira, T.F., Antunes, D.A., Franco, A.C., Roehle, L.R., Oliveira, M.T., Campos, F.S., Dezen, D., Cenci, A., Brito, W.D., Roehle, P.M., 2010. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Vet. Microbiol.* 142, 254–260.
- Vogel, F.S.F., Caron, L., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Mayer, S.V., Bastos, R.G., 2003. Distribution of Bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4512–4520.
- Weiblen, R., Barros, C.S.L., Ganabarro, T.F., 1989. Bovine encephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* 124, 666–667.

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Detection of genomes of Bovine herpesvirus 2 but no Bovine herpesvirus 4 and Ovine herpesvirus 2 DNA in trigeminal ganglia of cattle

O trabalho sobre a detecção de BoHV-2, BoHV-4 e OvHV-2 identificou a presença do DNA de BoHV-2 em gânglios trigêmeos e evidenciando que os gânglios trigêmeos de bovinos podem ser um sítio de latência para BoHV-2, mas não para BoHV-4 e OvHV-2. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado que um bovino pode estar latentemente infectado por três herpesvirus distintos: BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5.

Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine

No segundo capítulo desta tese a eficácia de uma vacina inativada preparada com adjuvante oleoso e uma amostra de BoHV-5 recombinante foi avaliada. Concluiu-se que a vacina inativada não evitou o estabelecimento da latência e nem impediu a reativação viral induzida por dexametasona, entretanto ela foi capaz de conferir proteção à encefalite nos animais vacinados após o desafio com o vírus selvagem. Além disso, essa amostra apresenta o potencial para aproveitamento como vacina diferencial, embora este aspecto não tenha sido avaliado neste estudo.

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. **Vet. Microbiol.**, v.113, p.211-222, 2006.
- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra-IBR eradication. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.293-302, 2006.
- ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.43, p.36-40, 1982.
- AFONSO, D.A.F.; ORTEGA, L.S.; REDONDO, R.A.F.; TRINDADE, G.S.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Characterization of field bovine herpesvirus samples using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.140, p.200-205, 2007.
- AGUIRRE, A.A.; HANSEN, D.E.; STARKEY, E.E.; MCLEAN, R.G. Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States. **Prev. Vet. Med.**, Netherlands, v. 21, p. 313-322, 1995.
- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Germany, v.48, n.8, p.613-21, 2001.
- ALEXANDER, R.A.; PLOWRIGHT, W.; HAIG, D.A. Cytopathogenic agents associated with lumpy-skin disease of cattle. **Bull Epizoot. Dis. Afr.**, Kenya, v.5, p.489-492, 1957.
- ALEXANDRINO, B.; BORGES, L.A.; SANTANA, L.F.; SÁNCHEZ, D.C.C.; OLIVEIRA, M.C.; AFFONSO, I.B.; MEDEIROS, A.S.R.; BUZINARO, M.G.; SAMARA, S.I. Antibodies against bovine herpesvirus type 1 in goats. In: **XXVI World Buiatrics Congress**, Santiago, Chile, 2010.
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da mamilita herpética bovina no Brasil. **Rev. Microbiol.**, Brasil, v.8, p.9-15, 1977.
- ALMEIDA, S.R.; DIEL, D.G.; RISSI, D.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Clinical and pathological characterization of acute mammillitis in lactating ewes inoculated with bovine herpesvirus 2. **Pesq Vet Bras**, Brasil, v.28, p.87-94, 2008.
- ANDERSON, I.E.; BUXTON, D.; CAMPBELL, I.; RUSSELL, G.; DAVIS, W.C.; HAMILTON, M.J.; HAIG, D.M. Immunohistochemical study of experimental malignant catarrhal fever in rabbits. **J. Comp. Pathol.**, England, v.136, p.156-166, 2007.
- ANZILIERO, D.; SANTOS, C.M.; BRUM, M.C.; WEIBLEN, R.; CHOWDHURY, S.I.; FLORES, E.F. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.154, p.14-22, 2011.
- ASANO, A.; INOSHIMA, Y.; MURAKAMI, K.; IKETANI, Y.; YAMAMOTO, Y.; SENTSU, H. Latency and persistence of Bovine herpesvirus type 4, strain b11-41, in bovine nervous tissues. **J. Vet. Med. Sci.**, Japan, v.65, p.87-93, 2003.
- 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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.9, n.4, p.387-394, 1997.

AUDIGE, L.; WILSON, P.R.; MORRIS, R.S. Disease and mortality on red deer farms in New Zealand. **Vet. Rec.**, England, v.148, n.11, p.334-340, 2001.

BARANOWSKI, E.; KEIL, G.; LYAKU, J.; RIJSEWIJK, F.A.; VAN OIRSCHOT, J.T.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.91-101, 1996.

BARKER, I.K.; VAN DREUMEL, A.A.; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v.2, cap.1, p.163-173.

BARTHA, A.; JUHASZ, M.; LIEBERMANN, H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. **Acta Vet. Hung.**, Hungary, v.16, p.357-358, 1966.

BAXTER, S.I.F.; POW, I.; BRIDGEN, A.; REID, H.W. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. **Arch. Virol.**, Austria, v.132, p.145-149, 1993.

BAXTER, S.I.F.; WIYONO, A.; POW, I.; REID, H.W. Identification of ovine herpesvirus-2 infection in sheep. **Arch. Virol.**, Austria, v.142, p.823-831, 1997.

BELAK, K.; KUCSERA, L.; ROS, C.; KULCSAR, G.; MAKRANSZKI, L.; SOOS, T.; BELAK, S. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.22, p.207-220, 1999.

BELAK, S.; PALFI, V. Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated bovine kidney cell culture. **Acta Vet. Acad. Sci. Hung.**, Hungary, v.24, p.249-253, 1974.

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

BİLGE-DAĞALP, S.; DEMİR, A.B.; GÜNGÖR, E.; ALKAN, F. The seroprevalence of Bovine Herpes Virus Type 4 (BHV4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders. **Rev. Med. Vet.**, France, v.4, p.201-205, 2007.

BOERNER, B.; WEIGELT, W.; BUHK, H.J.; CASTRUCCI, G.; LUDWIG, H. A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of Bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. **J. Virol. Methods**, Netherlands, v. 83, p. 169-180, 1999.

BRATANICH, A.C.; SARDI, S.I.; SMITSAART, E.N.; SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo – in vitro tests. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**, Germany, v.38, p.41-48, 1991.

BRIDGEN, A.; REID, H.W. Derivation of a DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. **Res. Vet. Sci.**, England, v.50, p. 38-44, 1991.

BROLL, H.; BUHK, H.J.; ZIMMERMANN, W.; GOLTZ, M. Structure and function of the prDNA and the genomic termini of the gamma2-herpesvirus Bovine herpesvirus type 4. **J. Gen. Virol.**, England, v.80, p.979-986, 1999.

BRUM, M.S.S.; CARON, L.; SHAFIQU, C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Immunogenicity of an inactivated bovine herpesvirus type 5 strain defective in thymidine kinase and glycoprotein E. **Pesq. Vet. Bras.**, Brasil, v.30, p. 57-62, 2010.

CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D.A.; SANTOS, H.F.; ARANTES, T.S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F.E.S.; BRITO, W.M.E.D.; FILHO, H.C.K.; BATISTA, H.B.C.R.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.148, p.18-26, 2011.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. High prevalence of co-infections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.139, p.67-73, 2009.

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

CASTRO, R.S.; ABREU, J.J.; LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.P.; CASTRO, M.E.B. Relato de um surto de "pseudo lumpy skin disease" em novilhas importadas, em Minas Gerais, Brasil. **Arq Bras Med. Vet. Zootec.**, Brasil v.40, p.305-311, 1988.

CASTRUCCI, G.; FERRARI, M.; FRIGERI, F.; RANUCCI, S.; CILLI, V.; TESEI, B.; RAMPICHINI, L. Reactivation in calves of bovid herpesvirus 2 latent infection. **Arch. Virol.**, Austria v.72, p.75-81, 1982.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; CILLI, V.; DONELLI, G.; FERRARI, M.; CHICCHINI, U.; BORDONI, E. A study of a herpesvirus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.9, p.13-21, 1986.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; CILLI, V.; ALDROVENDI, V.; RAMPICHINI, L.; GATTI, R. A study of the pathogenesis of bovid herpesvirus-4 in calves. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v.34, p.473-479, 1987a.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; PEDINI, B.; ALDROVENDI, V.; CILLI, V.; RAMPICHINI, L.; GATTI, R. Reactivation in calves of latent infection by bovid herpesvirus-4. **Microbiologica**, Italy, v.10, p.37-45, 1987b.

CASTRUCCI, G.; MARTIN, W.B.; PEDINI, B.; CILLI, V.; RANUCCI, S. A comparison in calves of the antigenicity of three strains of bovid herpesvirus 2. **Res. Vet. Sci.**, England, v.18, p.208-215, 1975.

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. **Can. J. Comp. Med.**, Canada, v.49, n.2, p.189-94, 1985.

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

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOSIACKI, S.R.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.128, n.1-2, p.183-188, 2005.

COULTER, L.J.; WRIGHT, H.; REID, H.W. Molecular genomic characterization of the viruses of malignant catarrhal fever. **J. Comp. Pathol.**, England, v.124, p.2-19, 2001.

COUTLEE, F.; HE, Y.; SAINT-ANTOINE, P.; OLIVIER, C.; KESSOUS, A. Coamplification of HIV type I and beta-globin gene DNA sequences in a nonisotopic polymerase chain reaction assay

to control for amplification efficiency. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, United States, v.11, p.363–71, 1995.

DARDIRI, A.H.; STONE, S.S. Serologic evidence of dermopathic bovine herpesvirus infection of cattle in the United States of America. **Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health. Assoc.**, United States, v.76, p.156-171, 1972.

DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.69-88, 2002.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Arch. Virol.**, Austria, v.154, p.171-177, 2009.

DEBIASI, R.L. ; TYLER, K.L. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. **Clin. Microbiol. Rev.**, United States, v.17, p.903-925, 2004.

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

DEIM, Z.; SZEREDI, L.; EGYED, L. Detection of Bovine herpesvirus-4 DNA in aborted bovine fetuses. **Can. J. Vet. Res.**, Canada, v.71, p.226-229, 2007.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.; SADIR, A.M.; ROMERA, S.A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BoHV-5 disease in cattle. **Res. Vet. Sci.**, England, v.81, p.327-334. 2006.

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. **J. Virol.**, United States, v.77, p.10339-10347, 2003.

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. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.54, p.534-539, 1993.

DONOFRIO, G.; CAVIRANI S.; FLAMMINI C.F.; SCATOZZA F. Molecular typing of a Bovine herpesvirus 4 field isolate. **Vet. Res. Commun.**, Netherlands, v.24, p.411-422, 2000.

DONOFRIO, G.; CAVIRANI, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; GILLET, L.; FLAMMINI, C.F. Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. **Clin. Vaccine Immunol.**, United States, v.13, p.1246–1254, 2006.

DONOFRIO, G.; FRANCESCHI, V.; CAPOCEFALO, A.; CAVIRANI, S.; SHELDON, I.M. Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, England, v.7, p.83, 2009.

DONOFRIO, G.; HERATH, S.; SARTORI C.; CAVIRANI, S.; FLAMMINI, C.F.; SHELDON, I.M. Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. **Reproduction**, England, v.134, p.183-187, 2007.

DRIEMEIER, D.; BRITO, M.F.; TRAVERSO, S.D.; CATTANI, C.; CRUZ, C.E.F. Outbreak of malignant catarrhal fever in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in Brazil. **Vet. Rec.**, England, v.151, p.271-272, 2002.

- DUBUISSON, J.; THIRY, E.; BUBLLOT, M.; THOMAS, I.; VAN BRESSEM, M.F.; COIGNOUL, F.; PASTORET, P.P. Experimental Infection of Bulls with a Genital Isolate of Bovine Herpesvirus-4 and Reactivation of Latent Virus with Dexamethasone. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.21, p.97-114, 1989.
- EGYED, L.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BARTHA, A.; BELÁK, S. Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.34, p.1091-1095, 1996.
- EGYED, L.; BARTHA, A. PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. **Vet. Res. Commun.** Netherlands, v.22, p.209-216, 1998.
- EGYED, L. Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.36, p.2109-2111, 1998.
- EGYED, L.; SASSI, G.; TIBOLD, J.; MÁDL, I.; SZENCI, O. Symptomless intrauterine transmission of Bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. **Microb. Pathog.**, England, v. 50, p. 322-325, 2011.
- EHLERS, B.; BUHK, H.J.; LUDWIG, H. Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyreplicative DNA unit, and comparison of European and American strains. **J. Gen. Virol.**, England, v.66, p.55-68, 1985.
- 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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.8, p.487-492, 1996.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.3-15, 1996.
- ENGELS, M.; PALATINI, M.; METZLER, A.E.; PROBST, U.; KIHM, U.; ACKERMANN, M. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and the foreign hosts, **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.33, p.69-78, 1992.
- ENQUIST, L.W.; TOMISHIMA, M.J.; GROSS, S.; SMITH, G.A. Directional spread of an α -herpesvirus in the nervous system. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.5-16, 2002.
- ESTEVEZ, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCIZANELLA, 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 Res.**, Netherlands, v.131, p.16-22, 2008.
- ESTEVEZ, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Vet. Rec.**, England, v.152, p.658-659, 2003.
- EVERMANN, J.F.; MUELLER, G.M.; DILBECK, P.M. Clinical and diagnostic implications of bovid herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus) infections. **Am. Assoc. vet Lab. Diag. Proc.**, United States, v.27, p.125-136, 1985.
- FOERSTER, C.; KOENIG, M.; THIEL, H.J. Macaviruses in wild and small domestic ruminants. **GenBank**, United States, Submitted 28-APR-2010.

FORSTER, E. Rapid Generation of Internal Standards for Competitive PCR by Low-Stringency Primer Annealing. **Biotechniques**, United States, v.16, p.1007-8, 1994.

FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; BATISTA, H.B.C.R.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. Construction and characterization of a Bovine herpesvirus 5 mutant with a deletion of the gI, gE and US9 genes. **Braz. J. Microbiol.**, Brasil, v.38, p.667-673, 2007.

FRANCO, A.C.; SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; LIMA, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIJSEWIK, F.A.M.; ROEHE, P.M. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BoHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesq Vet Bras**, Brasil, v.22, p.135-140, 2002.

FRAZIER, K.; BALDWIN, C.A.; PENCE, M.; WEST, J.; BERNARD, J.; LIGGET, A.; MILLER, D.; HINES, M.E. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic Bovine herpesvirus 4. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.14, p.457-462, 2002.

FRAZIER, K.; PENCE, M.; MAUEL, M.J.; LIGGETT, A.; HINES 2nd, M.E., SANGSTER, L.; LEHMKUHL, H.D.; MILLER, D.; STYER, E.; WEST, J.; BALDWIN, C.A. Endometritis in postparturient cattle associated with Bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v. 13, p. 502-508, 2001.

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

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. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.37, p.2498-2507, 1999.

FULTON, R.W.; DROWNING, M.M.; HAGSTAD, H.V. Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea, parainfluenza-3, bovine adenovirus-3 and -7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.42, p.1454-1457, 1982.

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. **J. Gen. Virol.**, England, 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. **J. Gen. Virol.**, England, v.86, p.1987-1996, 2005.

GENBANK. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 04 de setembro de 2012.

GERAGHTY, R.J.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. **Science**, United States, v.280, p.1618-1620, 1998.

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

GIBBS, E.P.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. **Vet. Bull**, England, v.47, p. 411-425, 1977.

GILLET, L.; MINNER, F.; DETRY, B.; FARNIR, F.; WILLEM, L.; LAMBOT, M.; THIRY, E.; PASTORET, P.P.; SHYNTS, F.; VANDERSPLASSEHEN, A. Investigation of the susceptibility

of human cell lines to Bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **J. Virol.**, Netherlands, v.78, p.2336–2347, 2004.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Vet. Res. Commun.**, Netherlands, v.27, p.495-504, 2003.

GOYAL, S.M.; NAEEM, K. Bovine herpesvirus-4: a review. **Vet Bull**, England, v.62, p.181-201, 1992.

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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.9, p.24-31, 1997.

GRECO, A.; BAUSCH, N.; COUTE, Y.; DIAZ, J.J. Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of host proteins whose synthesis is sustained or stimulated during the course of herpes simplex virus type 1 infection. **Electrophoresis**, Germany, v. 21, p. 2522-2530, 2000.

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. **Prev. Vet. Med.**, Netherlands, v.34, p.97-106, 1998.

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. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.57, p.41-54, 1997.

HAIG, D.M.; GRANT, D.; DEANE, D.; CAMPBELL, I.; THOMSON, J.; JEPSON, C.; BUXTON, D.; RUSSELL, G.C. An immunisation strategy for the protection of cattle against alcelaphine herpesvirus-1-induced malignant catarrhal fever. **Vaccine**, v.26, p.4461-4468, 2008.

HANON, E.; KEIL, G.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P.; VANDERPLASSCHEN, A.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BABIUK, L.; PASTORET, P.P. Bovine herpesvirus 1 - induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. **Virology**, United States, v.257, p.191-197, 1999.

HARROP, J.A.; MCDONNELL, P.C.; BRIGHAM-BURKE, M.; LYN, S.D.; MINTON, J.; TAN, K.B.; DEDE, K.; SPAMPANATO, J.; SILVERMAN, C.; HENSLEY, P.; DIPRINZIO, R.; EMERY, J.G.; DEEN, K.; EICHMAN, C.; CHABOT-FLETCHER, M.; TRUNEH, A.; YOUNG, P.R. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. **J. Biol. Chem.**, United States, v.273, p. 27548-27556, 1998.

HART, J.; ACKERMANN, M.; JAYAWARDANE, G.; RUSSELL, G.; HAIG, D.M.; REID, H.; STEWART, J.P. Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. **J. Gen. Virol.**, England, v.88, p.28–39. 2007.

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. **J. Neurovirol.**, United States, v.10, p.64-70, 2004.

HENTGES, L.P.; CAMPOS, F.S.; OLIVEIRA, G.C.; TORRES, F.D.; GASPARIN, B.G.; FIRPO, R.; GONÇALVES, P.B.D, ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. Molecular detection of bovine

herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhoea virus in follicular fluids and semen from cattle in Southern Brazil. *In prep.*

HIMSWORTH, C.G.; HARMS, N.J.; WOBESER, G.; HILL, J. Bilateral perirenal hemorrhage in two Stone's sheep (*Ovis dalli stonei*): a possible manifestation of malignant catarrhal fever. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.20, p.676-8, 2008.

HINKLEY, S.; AMBAGALA, A.P.; JONES, C.J.; SRIKUMARAN, S. A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. **Arch. Virol.**, Austria, v.145, p.2027-2046, 2000.

HOMAN, E.J.; EASTERDAY, B.C. Further studies of naturally occurring latent bovine herpesvirus infection. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.42, p.1811-1813, 1981.

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. **J. Vet. Med. Sci.**, Japan, v.57, p.577-580, 1995.

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

HÜSSY, D.; JANETT, F.; ALBINI, S.; STÄUBER, N.; THUN, R.; ACKERMANN, M. Analysis of the Pathogenetic Basis for Shedding and Transmission of Ovine Gamma Herpesvirus 2. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.40, p.4700-4704. 2002.

HUYGELEN, C.; THLENPONT, D.; VANDERVELDEN, M. Isolation of a cytopathogenic agent from skin lesions of cattle. **Nature**, England, v. 186, p. 979-980, 1960.

ICTVDB MANAGEMENT. 00.031.1.01.001 Human herpesvirus 1. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database**. International Committee of Taxonomy of Viruses. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. v.4, 2006.

IMAI, K; ISHIHARA, R; JAYAWARDANE, G.W.; NISHIMORI, K.; NISHIMORI, T. Development of a shuttle polymerase chain reaction for the detection of bovine herpesvirus 2. **J. Vet. Med. Sci.**, Japan, v.64, p.953-6, 2002.

IMAI, K.; ISHIHARA, R.; NISHIMORI, T. First demonstration of bovine herpesvirus 2 infection among cattle by neutralization test in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, Japan, v.67, p.317-320, 2005.

IZUMI, Y.; TSUDUKU, S.; MURAKAMI, K.; TSUBOI, T.; KONISHI, M.; HARITANI, M.; KAMIYOSHI, T.; KIMURA, K.; SENTSUI, H. Characterization of Bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. **J. Vet. Med. Sci.**, Japan, v.68, p.189-93, 2006.

JACKSON, P. Differential diagnosis of common bovine skin disorders Part 1. **In Pract.**, England, v.15, p.119-127, 1993.

JACOBSON, J.G.; CHEN, S.H.; COOK, W.J.; KRAMER, M.F.; COEN, D.M. Importance of the Herpes Simplex Virus UL24 Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. **Virology**, United States, v.242, p.161-169, 1998.

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. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.199-210, 2006.

JORDAN, L.T.; RETTIE, W.J.; TESSARO, S.V. Evidence of herpesvirus infection in Woodland Caribou in Saskatchewan, **J. Wildl. Dis.**, United States, v.39, p.216-220, 2003.

KAASHOEK, M.J.; MOERMAN, A.; MADIC, J.; WEERDMEESTER, K.; MARIS-VELDHUIS, M.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, Netherlands, v.13, p.342-346, 1995.

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. **Vet. Rec.**, England, v.139, p.416-421, 1996.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, United States, v.171, p.1055-1064, 1977.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. **In: Viral disease of cattle**. 2 ed. Ames: Iowa State University Press, cap.18, p.159-170, 2001.

KALMAN, D.; EGYED, L. PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in Hungary. **J. Wildl. Dis.**, United States, v.41, p.482-488, 2005.

KEMP, R.; HOLLIMAN, A.; NETTLETON, P.F. Atypical herpes mammillitis affecting cows and calves. **Vet. Rec.**, England, v.163, p.119-121, 2008.

KIRKBRIDE, C.A. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.4, p.374-379, 1992.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R.J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **Vet. Rec.**, England, v.165, p.111-113, 2009.

KOPPERS-LALIC, D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VERSCHUREN, S.B.E.; VAN GAANS-VAN DEN BRINK, J.A.M.; NEISIG, A.; RESSING, M.E.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E.J.H.J. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. **J. Gen. Virol.**, England, v.82, p.2071-2081, 2001.

KRAMPS, J.A.; BANKS, M.; BEER, M.; KERKHOFS, 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. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.102, p.169-181, 2004.

KRAMPS, J.A.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; WEERDMEESTER, 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. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.32, 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. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.153-161, 1996.

KROGMAN, L.A.; MCADARAGH, J.P. Recrudescence of bovine herpesvirus-5 in experimentally infected calves. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.43, p.336-338, 1982.

KRÜGER, E.R. **Herpesvírus bovino 4 (BoHV-4): isolamento e caracterização; desenvolvimento de elisa indireto para diagnóstico**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná,

2012. 87 f. Tese de doutorado - Programa de Doutorado em Processos Biotecnológicos, UFPR, Curitiba.

KUPFERSCHMIED, H.U.; KIHM, U.; BACHMANN, P.; MÜLLER, K.H.; ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. **Theriogenology**, United States, v.25, p.439-443; 1986.

LAGE, A.P.; CASTRO, R.S.; MELO, M.I.; AGUIAR, P.H.; BARRETO FILHO, J.B.; LEITE, R.C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.**, France, v.49, p.195-197, 1996.

LEHMANN, D.; SODOYER, R.; LETERME, S.; CREVAT, D. Improvement of serological discrimination between herpesvirus-infected animals and animals vaccinated with marker vaccines. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.59-68, 2002.

LEMONS, R.A.A. **Enfermidades do Sistema Nervoso de Bovinos de Corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil**. 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2005.

LETCHWORTH, G.J.; CARMICHAEL, L.E. Local tissue temperature: a critical factor in the pathogenesis of bovid herpesvirus 2. **Infect. Immun.**, United States, v.43, p.1072-1079, 1984.

LETCHWORTH, G.J.; CARMICHAEL, L.E.; LEIN, D.H. Bovid herpesvirus 2: natural spread among breeding bulls. **Cornell Vet**, United States, v.72, p.200-210, 1982.

LETCHWORTH, G.J.; LADUE, R. Bovine herpes mammillitis in two New York dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, United States, v.180, p.902-907, 1982.

LI, H.; SHEN, D.T.; JESSUP, D.A.; KNOWLES, D.P.; GORHAM, J.R.; THORNE, T.; O'TOOLE, D.; CRAWFORD, T.B. Prevalence of antibody to malignant catarrhal fever virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition ELISA. **J. Wildl. Dis.**, United States, v.32, 437-443, 1996.

LI, H.; SHEN, D.T.; KNOWLES, D.P.; GORHAM, J.R.; CRAWFORD, T.B. Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.32, p.1674-1679, 1994.

LI, H.; SHEN, D.T.; O'TOOLE, D.; KNOWLES, D.P.; GORHAM, J.R.; CRAWFORD, T.B. Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.33, p. 2048-2053, 1995.

LI, H.; SNOWDER, G.; O'TOOLE, D.; CRAWFORD, T.B. Transmission of ovine herpesvirus 2 among adult sheep. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.71, p.27-35, 2000.

LI, H.; TAUS, N.S.; JONES, C.; MURPHY, B.; EVERMANN, J.F.; CRAWFORD, T.B. A devastating outbreak of malignant catarrhal fever in a bison feedlot. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.18, p.119-123. 2006.

LI, H.; TAUS, N.S.; LEWIS, G.S.; KIM, O.; TRAU, D.L., CRAWFORD, T.B. Shedding of Ovine Herpesvirus 2 in Sheep Nasal Secretions: the Predominant Mode for Transmission. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.42, p.5558-5564, 2004.

- LI, H.; WESTOVER, W.C.; CRAWFORD, T.B. Sheep-associated malignant catarrhal fever in a petting zoo. **J. Zoo Wildl. Med.**, United States, v.30, p.408-412, 1999.
- LI, Y.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L.A.; LIANG, X., Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **J. Virol.**, United States, v.69, p.4758-4768, 1995.
- LIANG, X.; PYNE, C.; LI, Y.; BABIUK, L.A.; KOWALSKI, J. Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. **Virology**, United States, v.207, p.429-441, 1995.
- LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. **Arch. Virol.**, Austria, v.145, p.2047-59, 2000.
- LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; FROIS, M.C.M.; RIBEIRO, E.B.T.; DIAS, G.R.C.; TEIXEIRA, B.M.; LIMA, F.A.; ALMEIDA, G.M.F.; KROON, E.G. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Brasil, v.57, p. 424-429, 2005.
- LØKEN, T.; ALEKSANDERSEN, M.; REID, H.; POW, I. Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. **Vet. Rec.**, England, v.143, p. 464-467, 1998.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola, Brasília 2011. Dados de rebanho bovino e bubalino do Brasil. Disponível em: www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Dados%20de%20rebanho%20bovino%20e%20bubalino%20do%20Brasil_2011.pdf. Acessado dia: 04/09/12.
- MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; FRANKEN, P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine**, Netherlands, v.19, p.1924-1930, 2001.
- 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. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.76, p.1-13, 2000.
- MARTIN, W.B.; GWYNNE, M. Antibodies to the group II lumpy skin disease virus in the sera of cattle in Kenya. **Bull Epizoot. Dis. Afr.**, Kenya, v.16, p.217-222, 1968.
- MARTIN, W.B.; JAMES, H.; LAUDER, I.M.; MURRAY, M.; PIRIE, H.M. Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.30, p.2152-2165, 1969.
- MARTIN, W.B.; MARTIN, B.; HAY, D.; LAUDER, I.M. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. **Vet. Rec.**, England, v. 78, p. 494-497, 1966
- MARTIN, W.B.; SCOTT, F.M.M. Latent infection of cattle with bovid herpesvirus 2. **Arch. Virol.**, Austria, v.60, p.51-58, 1979.
- MAY J.T. Comparison of six Australian isolates of Bovine herpes virus 2 based on UL24 gene after a passage in MDBK cells. **Acta Virol.**, Slovakia, v.46, p.175-8. 2002
- MCGEOCH, D.J.; COOK, S. Molecular phylogeny of the Alphaherpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale. **J. Mol. Biol.**, England, v.238, p.9-22, 1994.

MCGEOCH, D.J.; RIXON, F.J.; DAVISON, A.J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Res.**, Netherlands, v.117, p.90-104, 2006.

MELANCON, J.M.; FOSTER, T.P.; KOUSOULAS, K.G. Genetic Analysis of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL 20 Protein Domains Involved in Cytoplasmic Virion Envelopment and Virus-Induced Cell Fusion. **J. Virol.**, United States, v.78, p.7329-7343, 2004.

METTENLEITER, T.C. Herpesvirus Assembly and Egress. **J. Virol.**, United States, v.76, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, England, 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. **Arch. Virol.**, Austria, v.87, p.205-217, 1986.

METZLER, A.E.; WYLER, R. Prevalence of bovine herpesvirus 4 in the Swiss cattle population and possible serological cross-reaction with bovine herpesvirus 1 (IBR-IPV virus). **Schweiz. Arch. Tierheilkd.**, Switzerland, v.128, p.459-467, 1986.

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

MEYER, G.; HANON, E.; GEORLETTE, D.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. **J. Gen. Virol.**, England, v.79, p.1983-1987, 1998.

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. **Arch. Virol.**, Austria, v.146, p.633-52, 2001.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.45, p.790-794, 1984.

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, **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.52, p.458-461, 1991.

MISRA, V.; WALKER, S.; HAYES, S.; O'HARE, P. The bovine Herpesvirus a gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its Herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. **J. Virol.**, United States, v.69, p.5209-5216, 1995.

MONGE, A.; ELVIRA, L.; GONZALEZ, J.V.; ASTIZ, S.; WELLENBERG, G.J. Bovine herpesvirus 4 associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. **Res. Vet. Sci.**, England, v.80, p.120-125, 2006.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C. **Herpesviridae**. In: MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C. *Veterinary virology* 3.ed. San Diego: Academic Press, p.301-326. 1999.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, F.S.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Res.**, France, 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. **Jpn. J. Vet. Res.**, Japan, v.44, p.165-174, 1996.
- NAEEM, K.; MURTAUGH, M.P.; GOYAL, S.M. Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits, and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. **Arch. Virol.**, Austria, v.119, p.239-255, 1991.
- NARITA, M.; INUI, S.; NAMBA, K.; SHIMIZU, Y. Neural changes in calves after intraconjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.39, p.1399-1403, 1978.
- NIKOLIN, V.M.; DONOFRIO, G.; MILOSEVIC, B.; TADDEI, S.; RADOSAVLJEVIC, V.; MILICEVIC, V. First Serbian isolates of Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. **New Microbiol.**, Italy, v.30, p.53-57, 2007.
- OIE, World organization for animal health - **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 6th edition, 2008. Disponível em <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>, acessado dia 04/09/12.
- OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of Bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from brazilian bulls. **Theriogenology**, United States, v.75, p.1139-45, 2011.
- OSORIO, F.A.; REED, D.E. Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.44, p.975-980, 1983.
- OSORIO, F.A.; REED, D.E.; ROCK, D.L. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.7, p.503-513, 1982.
- PALLEN, M.J.; PUCKEY, L.H.; WREN, B.W. A rapid, simple method detecting PCR failure. **Genome Res.**, United States, v.2, p.91-2, 1992.
- PARKS, J.B.; KENDRICK, J.W. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. **Arch. Gesamte Virusforsch**, Austria v.41, p.211-215, 1973.
- PASTORET, P.P.; AGUILAR-SETIEN, A.; BURTONBOY, G.; MAGER, J.; JETTEUR, P.; SCHOENAERS, F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.4, p.149-159, 1979.
- PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency, **Ann. Rech. Vét.**, France, v.13, p.221-235, 1982.
- PAYMENT, P.; ASSAF, R.; TRUDEL, M.; MAROIS, P. Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious bovine rhinotracheitis virus infection. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.10, p.633-636, 1979.
- PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B. **The Herpesviridae: a brief introduction**. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds) *Fields virology*, 5th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, p.2479-2499, 2006.
- PEPPER, T.A.; STAFFORD, L.P.; JONSON, R.H.; OSBORNE, A.D. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. **Vet. Rec.**, England, v.78, p.569, 1966.

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

PEREZ, S.E.; VERNA, A.E.; LEUNDA, M.R.; FAVIER, P.A.; CERIANI, M.C.; MORÁN, P.E.; ODEÓN, A.C.; ESTEBAN, E.N. Occurrence of bovine herpesvirus type 4 DNA in Argentinean Holstein cattle from Santiago del Estero, Argentina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, Brasil, v.48, p.6, 2011.

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. **Rev. Off. Int. Epizoot.**, France, v.12, p.969-984, 1993.

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. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Germany, v.46, 453-456, 1999.

PLOWRIGHT, W. **Malignant catarrhal fever virus**. In: MOREIN, B.; DINTER, Z. (ed.). *Virus Infections of Ruminants*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1990. Cap.14, p.123-150.

PROBERT, M.; POVEY, R.C. Experimental studies concerning the possibility of a latent carrier state in bovine herpes mammillitis (BHM). **Arch. Virol.**, Austria, v.48, p.29-38, 1975.

QIAGEN. **Qiagen sample & assay technologies**. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=228>>. Acesso em 09 de setembro de 2012.

REBORDOSA, X.; PINOL, J.; PEREZ-PONS, J.A.; LLOBERAS, J.; NAVAL, J.; SERRA-HARTMANN, X.; ESPUNA, E.; QUEROL, E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Res.**, Netherlands, v.45, p.59-68, 1996.

REID, H.W.; BUXTON, D.; POW, I.; FINLAYSON, J. Isolation and characterization of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with 'sheep-associated' malignant catarrhal fever. **Res. Vet. Sci.**, England, v.47, p.90-96, 1989.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERNANDES, C.G. Enfermidades do sistema nervoso dos ruminantes no sul do Rio Grande do Sul. **Cienc. Rural**, Brasil, v.28, p.341-348, 1998.

ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Semin. Virol.**, United States, v.5, p.233-240, 1994.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.17, p.41-44, 1997a.

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). **Arq. Inst. Biol.** (São Paulo), Brasil, v.59, p.27-32, 1997b.

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. **Vet. Rec.**, England, v.146, p.586-588, 2000.

ROIZMAN, B.; CARMICHAEL, L.E.; DEINHARDT, F.; DE-THE, G.; NAHMIAS, A.J.; PLOWRIGHT, W.; RAPP, F.; SHELDRIK, P.; TAKAHASHI, M.; WOLF, K. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirol.**, v.16, n.4, p.201-217, 1981.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, Austria, v.123, p.425-448, 1992.

ROIZMAN, B.; KNIPE, M.D. Herpes simplex virus and their replication. In **Fields Virology**, 4th ed., United States: Lippincott Williams and Wilkins publishers, v.1 and 2, 2001.

ROIZMAN, B.; PELLETT P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction, in: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), In **Fields Virology**, 4th ed., United States: Lippincott Williams and Wilkins publishers, p.2381-2398, 2001.

ROS, C; RIQUELME, M.E.; FORSLUND, K.O.; BELAK, S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.83, p.55-65, 1999.

ROSSITER, P.B.; GUMM, I.D.; MIRANGI, P.K. Immunological relationships between malignant catarrhal fever virus (alcelaphine herpesvirus 1) and bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 3). **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.16, p.211-8, 1988.

RUSSELL, G.C.; STEWART, J.P.; HAIG, D.M. Malignant catarrhal fever: a review. **Vet. J.**, England, v.179, p.324-335, 2009.

RWEYEMAMU, M.M.; JOHNSON, R.H.; MCCREA, M.R. Bovine herpes mammillitis virus. Observations on experimental infection. **Br. Vet. J.**, England, v.124, p.317-324, 1968.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.A. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.18, p.75-82, 1998.

SAWTELL, N.M.; POON, D.K.; TANSKY, C.S.; THOMPSON, R.L. The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. **J. Virol.**, United States, v.72, p.5343-5350, 1998.

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

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

SCHUDEL, A.A.; CARRILLO, B.J.; WYLER, R.; METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, Germany, v.33, p.303-310, 1986.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminants. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.17-29, 1996.

SCOTT, F.M.M.; HOLLIMAN, A. Serum antibodies to bovine mammillitis virus in pregnant heifers. **Vet. Rec.**, England, v.114, p.19, 1984.

SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; HÜBNER, S.O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A.P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P.M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, Netherlands, v.24, p.3313-3320, 2006.

SILVA, A.M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; SUR, H.J.; OSORIO, F.A.; FLORES, E.F. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.66, n.2, p.89-99, 1999.

SILVA, L.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1471-1474, 2007b.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.27, p.403-408, 2007a.

SINDAM (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal), 2010. CPSV (**Compêndio de Produtos Veterinários**), Pesquisa, Pesquisa produtos (Classe Terapêutica: Vacinas; Princípio ativo: Rinotraqueíte Infecciosa bovina), Buscar. <http://www.sindan.org.br> (acesso: 09 de setembro de 2012).

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 (CpHV-1) in calves. **Arch. Virol.**, Austria, v.146, p.1325-1335, 2001.

SMEE, D.F.; LEONHARDT, J.A. Vaccination against bovine herpes mammillitis virus infections in guinea pigs. **Intervirology**, Switzerland, v.37, p.20-24, 1994.

SMITH, B.P. **Diseases of the alimentary tract: malignant catarrhal fever**. In: Smith, B.P. Large animal internal medicine. 3ed. St Louis: Mosby, p.714- 716, 2002.

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.**, United States, v.98, p.3466-3470, 2001.

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

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; GONÇALVES, D.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.K.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.22, p.13-18, 2002.

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

SPILKI, F.R.; SILVA, A.D.; HUBNER, S.; ESTEVES, P.A.; FRANCO, A.C.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P.M. Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, United States, v.1026, p.247-250, 2004.

STORZ, J.; OKUNA, N.; McCHESNEY, A.E.; PIERSON, R.E. Virologic studies on cattle with naturally occurring and experimentally induced malignant catarrhal fever. **A. J. Vet. Res.**, United States, v. 37, p.875-878, 1976.

TAUS, N.S.; OAKS, J.L.; GAILBREATH, K.; TRAU, D.L.; O'TOOLE, D.; LI, H. Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.16, p.29-36, 2006.

TEIXEIRA, M.F.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. **Pesqui. Vet. Gau.**, Brasil, v.4, p.61-65, 1998.

TEIXEIRA, M.F.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). **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.21, p.33-37, 2001.

THIRY, E.; LEMAIRE, M.; SCHYNTS, F.; MEYER, G.; DISPAS, M.; GOGEV, S. Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Point Vét.**, France, v.199, p.279-285, 1999

THIRY, E.; PASTORET, P.P.; DESSY-DOIZE, C.; HANZEN, C.; CALBERG-BACQ, C.M.; DAGENAIX, L.; VINDEVOGEL, H.; ECTORS F. Réactivation d'un herpesvirus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. **Ann. Méd. Vét.**, Belgium, v.125, p.207-214, 1981.

THIRY, E.; SALIKI, J.; BUBLLOT, M.; PASTORET, P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.10, p.59-63, 1987.

THIRY, E.; VERCOUTER, M.; DUBUISSON, J.; BARRAT, J.; SEPULCHRE, C.; GERARDY, C.; MEERSSCHAERT, C.; COLLIN, B.; BLANCOU, J.; PASTORET, P.P. Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. **J. Wildl. Dis.**, United States, v.24, p.268-273, 1988.

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

THOMPSON, R.L.; SAWTELL, N.M. Replication of herpes simplex virus type 1 within trigeminal ganglia is required for high frequency but not high viral genome copy number latency. **J. Virol.**, United States, v.74, p.965-974, 2000.

THONUR, L.; RUSSELL, G.C.; STEWART, J.P.; HAIG, D.M. Differential transcription of ovine herpesvirus 2 genes in lymphocytes from reservoir and susceptible species. **Virus Genes**, United States, v.32, p.27-35, 2006.

TOLARI, F.; WHITE, H.; NIXON, P. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. **Microbiologica**, Italy, v.13, p.67-71, 1990.

TORRES F.D.; ALMEIDA, S.R.; SILVA, M.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Distribution of latent bovine herpesvirus 2 DNA in tissues of experimentally infected sheep. **Res. Vet. Sci.**, England, v.87, p.161-6, 2009a.

TORRES, F.D.; BERNARDES, L.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Prevalência de anticorpos contra o vírus da mamilite herpética em bovinos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural**, Brasil, v.39, p.1901-1904, 2009b.

TRUMAN, D.; LUDWIG, H.; STORZ, J. Biology and distribution of bovine herpesvirus type 4 in cattle herds and insemination bulls. **J. Vet. Med. B**, Germany, v.33, p.485-501, 1986

TURNER, A.J.; KOVEDSY, L.; CIANTER, M.S.; NICHOLLS, W.A.; CHATHAM, R.O. Isolation of bovine herpes mammillitis virus from dairy cattle in Victoria. **Aust. Vet. J.**, England, v.50, p.578-579, 1974.

TURNER, A.J.; KOVEDSY, L.; MORGAN, I.R. Isolation and characterization of bovine herpesvirus mammillitis virus and its pathogenicity for cattle. **Aust. Vet. J.**, England, v.52, p.166-169, 1976.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.275-282, 2006.

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. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.31, p.3129-3135, 1993.

VAN MALDEREN, G.; VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G. Bovine herpesvirus 4: a seroepidemiological survey of the Belgian cattle population. **Diergeneesk. Tijdschr.**, Netherlands, v.56, p.364-371, 1987.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; WEERDMEESTER, K.; RIJSEWIJK, F.A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.67, p.23-34, 1997.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.43-54, 1996a.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; STEGEMAN, J.A. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **J. Biotechnol.**, Netherlands, v.44, p.75-81, 1996b.

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. **Vet. Rec.**, England, v.137, p.235-239, 1995.

VAN SCHAİK, G.; SHOUKRI, M.; MARTIN, S.W.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; HAGE, J.J.; DIJKHUIZEN, A.A. Modeling the effect of an outbreak of bovine herpesvirus type 1 on herd-level milk production of Dutch dairy farms. **J. Dairy Sci.**, United States, v.82, p.944-952, 1999.

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.; DEZEN, D.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpes-virus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.142, p.254-260, 2010.

VIKØREN, T.; LI, H.; LILLEHAUG, A.; JONASSEN, C.M.; BÖCKERMAN, I.; HANDELAND, K. Malignant catarrhal fever in free-ranging cervids associated with OvHV-2 and CpHV-2 DNA. **J. Wildl. Dis.**, United States, v.42, 797-807, 2006.

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

VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MORAES, M.P.; BRAGANÇA, J.F.M. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural

and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.98, p.185-196, 2004.

WAGTER, L. H.; GLAS, R. D.; BLEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELENBURG, 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. **Vet. Res. Commun.**, Netherlands, v.20, p.401-408, 1996.

WANG, K., LAU, T. Y., MORALES, M., MONT, E.K., STRAUS, S.E. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent Herpes simplex virus 1 and Varicella-zoster virus DNA in human trigeminal ganglia at the single-cell level. **J. Virol.**, United States, v.79, p.14079-14087, 2005.

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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.4, p.341-343, 1992.

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. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.78, p.79-84, 2001.

WELLENBERG, G.J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN DER VORST, T.J.K.; VAN VALKENGOED, P.H.R.; SCHUKKEN, Y.H.; WAGENAAR, F.; VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. **Vet. Rec.**, England, v. 147, p. 222-225, 2000.

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

WELLENBERG, G.J.; VAN ROOIJ, E.M.A.; MAISSAN, J.; VAN OIRSCHOT, J.T. The evaluation of newly developed immunoperoxidase monolayer assays to detect antibodies against bovine herpesvirus 4. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, United States, v.6, p.447-451, 1999.

WESTBURY, H.A. Infection of sheep and goats with bovid herpesvirus 2. **Res. Vet. Sci.**, England, v.31, p.353-357, 1981.

WHITLEY, R.J., ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus Infections. **Lancet**; England, v.357, p.1513-1518, 2001.

WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. **J. Virol.**, United States, v.73, p.8657-8668, 1999.

WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **J. Virol.**, United States, 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. **J. Virol.**, United States, v.66, p.2763-2772, 1992.

WIRTH, U.V.; GUNKEL, K.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. **J. Virol.**, United States, v.63, p.4882-4889, 1989.

WOODS, J.A.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; KREUGER, N.; SCOTT, F.M.; REID, H.W. Isolation of bovine herpesvirus 2 (BHV-2) from a case of pseudo-lumpy skin disease in the United Kingdom. **Vet. Rec.**, England, v.138, p.113-114, 1996.

YAMAMOTO, Y.; MURAKAMI, K.; INOSHIMA, Y.; NAKANE T.; SAIKA, K.; SENTSU, H. Characterization of a Bovine herpesvirus type 4 isolated from the spinal cord of a cow with astasia. **Arch. Virol.**, Austria, v.145, p.2363- 2370, 2000.

YESILBAG, K.; BILGE-DAGALP, S.; OKUR-GUMUSOVA S.; GUNGOR B. Studies on herpesvirus infections of goats in Turkey: prevalence of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Rev. Med. Vet.**, France, v.154, p.772-774, 2003.

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**, United States, v.324, p.327-339, 2004.