

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

**ANÁLISE DA REGIÃO CARBOXI-TERMINAL DA GLICOPROTEÍNA C (gC) E  
SUA UTILIZAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE HERPESVÍRUS BOVINOS  
TIPOS 1 (BoHV-1) E 5 (BoHV-5)**

**Doutorando: Paulo Augusto Esteves**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Cláudia Franco**

**Porto Alegre**

**2007**

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

**ANÁLISE DA REGIÃO CARBOXI-TERMINAL DA GLICOPROTEÍNA C (gC) E  
SUA UTILIZAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE HERPESVÍRUS BOVINOS  
TIPOS 1 (BoHV-1) E 5 (BoHV- 5)**

**Doutorando: Paulo Augusto Esteves\***

**Tese apresentada como requisito ao grau de Doutor  
em Ciências Veterinárias, área de Medicina  
Veterinária Preventiva – Virologia Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Cláudia Franco**

**Porto Alegre**

**2007**

**\* Biólogo, MSc**

**Paulo Augusto Esteves**

**ANÁLISE DA REGIÃO CARBOXI-TERMINAL DA GLICOPROTEÍNA C (gC) E  
SUA UTILIZAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE HERPESVÍRUS BOVINOS  
TIPOS 1 (BoHV-1) E 5 (BoHV- 5)**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin**  
**Membro da Comissão**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de humildemente agradecer e dedicar este trabalho a minha família (Muito obrigado por serem quem são, tudo foi sempre para e por vocês). Meus pais (Luiz e Carmem), minhas amadíssimas esposa (Alessandra) e filha (Mariane), irmãos (Luis, Jacqueline e Luciane), sobrinhos (Tamara, Fernando & Feijão, a mais recente aquisição da família) e eternos cunhados (Alexandre e Delmo). Não posso deixar passar em branco a gratidão à família de minha esposa (Clóvis, Mariones, Giuliano, Marcelo, Bel & Gabriel) que sempre estenderam a mão quando necessário.

Sou muitíssimo grato também ao Prof. Dr. e amigo Paulo Roehle, que foi a pessoa que abriu-me as portas do fantástico mundo da ciência e da virologia. Foi ele também a apresentar-me ao saudoso Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), ou carinhosamente IPV. Sem dúvidas um local privilegiado, afastado da agitação da cidade, perfeito para estudar, fazer experimentos e ótimos churrascos. Lá no IPV encontrei minha alma gêmea e grande amor de minha vida, Alessandra, e fiz muitos amigos ao longo deste período de dez anos, a vocês todos (Ana Cláudia & Frans, Anna, Cintia, Cinthya, Cláudio Chiminzazzo, Cristiane, Diocela, Diogenes, Eber, Fabiane, Fabrício, Fernando & Valeska, Franco, Helena, Júlio, Marcelo, Marjorie & Laura, Maurício, Rejane & Marcus, Regina, Renata, Ricardo, Rodrigo, Sílvia Melo, Sílvia Hübner & Dino/ Andressa, Suzana, Tamahini & Cícero/ Marina, Tamir, Thaís, Vanessa) meu mais caloroso muito obrigado! Agradeço também aos demais eternos colegas de laboratório (Aline, Bira, Dilmara, Simone, Marcelo & André).

Aos sempre presentes Odir Dellagostin, Cláudio Canal e Amauri Simonetti, muitíssimo obrigado por se colocarem sempre a disposição, não importando o tamanho do pepino. Presentes desde meu mestrado vocês fizeram, fazem e continuarão a fazer a diferença, muitíssimo obrigado!

Agradeço ao Dr. Frans Rijsewijk (e Ana Cláudia) pela incrível e inesquecível oportunidade de ter podido ir à Holanda realizar trabalhos relacionados a meu doutorado, muito obrigado pelo abrigo e companhia em nossas incursões na Europa.

Muito obrigado à diretoria do IPVDF (Dr. Augusto Cunha), demais técnicos (Drs. Alexandre Braga, José Antônio, Júlio Rosa, Maria Angélica), ex-técnicos do instituto (Paulo Reckziegel e Sylio Petzhold) bem como os demais funcionários do IPVDF. Meus

parabéns por dar esta oportunidade aos estagiários e estudantes das mais variadas áreas, vocês estão fazendo a diferença, acreditem.

Muito obrigado aos colegas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Sem seu apoio eu definitivamente não teria tido condições de terminar meu curso de doutorado. Agradeço simbolicamente a todos os colegas da unidade através da direção da Unidade Drs. Élsio Figueredo, Teresinha Marisa Bertol e Cláudio Bellaver; pesquisadores (Cátia, Doralice, Fátima, Iara & Marcelo, Jalusa, Janice, Laurimar, Liana, Mônica, Marcelo, Morés, Virgínia); demais técnicos do laboratório de sanidade (Alexandre, Armando, Beatriz, Bordin, Daiane, Franciana, Gérson, Magda, Maria, Marni, Marisete, Max, Neide, Tânia, Vissotto), ou do SEDISA (Lauren, Régia, Simaia e Suzana) e estagiários (Aline, Ediane e Marcelo), um grande abraço a todos. Muito obrigado às amigas Iara, Liana, Rejane e Virginia pelo apoio incondicional, vocês são excelentes pessoas, muito obrigado por dividir sua amizade e sabedoria.

Um carinhoso agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no nome de sua atual gestora a Dra. Ana Paula Ravazzollo, da comissão do programa de pós-graduação, e de nossos três anjos da guarda as secretárias Joce, Maria e Vera, muito obrigado por todo o apoio.

Muito obrigado à CAPES por financiar meus estudos de pós-graduação e possibilitar meu aperfeiçoamento fora do país.

A todos, meus mais humildes agradecimentos e desejos de vidas plenas, com muita saúde, paz e realizações.

Um mundo melhor é possível, basta acreditar e viver. Obrigado Pai.

**ANÁLISE DA REGIÃO CARBOXI-TERMINAL DA GLICOPROTEÍNA C (gC) E  
SUA UTILIZAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO ENTRE HERPESVÍRUS BOVINO  
TIPOS 1 (BoHV-1) E 5 (BoHV-5)**

**RESUMO**

Membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) tem sido associados a diferentes condições clínicas em bovinos. Assim, diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 é uma valiosa informação objetivando um melhor entendimento da patogenia e epidemiologia destes vírus no rebanho bovino. Contudo, métodos para diferenciação são escassos devido às reações cruzadas originadas da alta homologia genômica e antigênica entre estes vírus. O presente estudo concentrou-se na análise da região carboxi-terminal da glicoproteína C (nucleotídeos 16763 - 17337 em BoHV-1 e 17671 - 18242 em BoHV-5), uma vez que tal região apresentou características potenciais que permitissem a diferenciação entre estes vírus. Assim, no primeiro capítulo do presente trabalho a região carboxi-terminal da gC foi utilizada como alvo para o desenvolvimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida da Análise da Restrição Enzimática (REA) do fragmento amplificado, capaz de diferenciar entre isolados de BoHV-1 ou BoHV-5, gerando fragmentos com tamanhos de 575 pares de base (pb) frente a BoHV-1 e 572 pb frente a BoHV-5. A diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 foi obtida após a digestão dos amplicons com a enzima de restrição *Bgl* I. No segundo capítulo, a região carboxi-terminal de 23 amostras Sul-Americanas de BoHV-1 ou BoHV-5 foram amplificadas e sequenciadas. A análise filogenética realizada com as sequências de nucleotídeos revelou identidade variando entre 98,7 a 99,8% (BoHV-1/ BoHV-1), 88,3 a 92% (BoHV-1/ BoHV-5) e 96 to 99,7% (BoHV-5/ BoHV-5). Alinhamentos realizados com sequências de aminoácidos revelaram identidade variando entre 97,5 a 99,5% (BoHV-1/ BoHV-1), 77,5 a 84,4% (BoHV-1/ BoHV-5) e 92,1 a 99,5% (BoHV-5/ BoHV-5). Análises filogenéticas revelaram, ainda, que: i) alguns isolados de BoHV-5 apresentaram um padrão diferente daqueles até o presente reconhecidos; ii) uma amostra isolada no Uruguai (BoHV-1.2) apresentou um padrão de agrupamento distinto quando comparado com as outras amostras de BoHV-1.2. O terceiro capítulo apresenta o primeiro relato de detecção de BoHV-5 de sêmen bovino através da análise antigênica, amplificação diferencial da região amino-terminal do gene da gC de BoHV-1 e 5, seguida da caracterização por REA do isolado em estudo. Em síntese, através da utilização da gC foi possível avaliar a homologia entre as amostras Sul- Americanas estudadas; desenvolver uma PCR/REA diferencial entre estes vírus e relatar a detecção de uma amostra de BoHV-5 isolada à partir de sêmen contaminado.

**ANALYSIS AND UTILIZATION OF GLYCOPROTEIN C (gC) CARBOXY-  
TERMINAL REGION IN THE DIFFERENTIATION OF BOVINE HERPESVIRUS  
TYPES 1 (BoHV-1) AND 5 (BoHV-5)**

**ABSTRACT**

*Members of the Herpesviridae family, Alphaherpesvirinae subfamily bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) have been associated to different clinical conditions of cattle. Thus, differentiation has become an important tool for a better understanding of the pathogenesis and epidemiology of BoHV infections in cattle. However, currently available methods for such differentiation are hampered by cross-reactions from high genomic and antigenic homology between these viruses. The present work focused on the analysis of the carboxy-terminal portion of glycoprotein C (gC), corresponding to nucleotides 16763 - 17337 on BoHV-1 and 17671 - 18242 on BoHV-5 once such region showed characteristics that would allow a clear distinction between BoHV-1 and 5. In view of that, in the first chapter, the carboxy-terminal region of gC was the target for the development of a Polymerase Chain Reaction followed by a Restriction Enzyme Analysis (PCR/REA) for differentiation between BoHV-1 and 5. The PCR/REA was designed to amplify a segment on the carboxy-terminal portion of the glycoprotein C (gC) gene, giving rise to amplicons of 575 base pairs (bp) for BoHV- 1, and 572 bp for BoHV-5. The amplicons were digested with the Bgl I for differentiation between BoHV-1 and 5. In the second chapter the region previously described of 23 South American isolates of BoHV-1 and BoHV-5 were amplified and sequenced. Nucleotide sequence alignments revealed identity ranged from 98,7 to 99,8% (BoHV-1/ BoHV-1), 88,3 to 92% (BoHV-1/ BoHV-5) and 96 to 99,7% (BoHV-5/ BoHV-5). The identity deduced from amino acid sequences ranged from 97,5 to 99,5% (BoHV-1/ BoHV-1), 77,5 to 84,4% (BoHV-1/ BoHV-5) and 92,1 to 99,5% (BoHV-5/ BoHV-5) . Phylogenetic analyses and deduced amino acid sequences revealed that: i) some BoHV-5 isolates seem to be “non a non b” subtype and ii) there is a Uruguayan BoHV-1.2 strain that has a distinct nucleotide and amino acid sequence when compared to others BoHV-1.2 strains. The third chapter of the present work contains the first report of a BoHV-5 strain isolated from the bovine semen by antigenic characterization, differential amplification of the N-terminal region of gC gene from BoHV-1 and 5 followed by genomic characterization by REA and antigenic characterization of the isolate analyzed.*

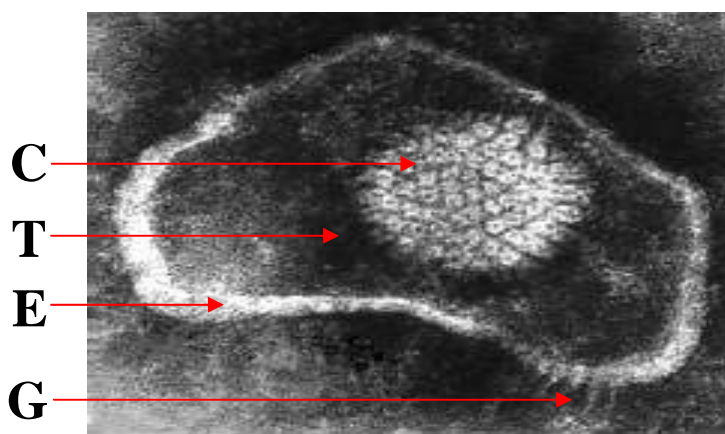
<b>SUMÁRIO</b>		<b>Pg.</b>
<b>RESUMO</b>		6
<b>ABSTRACT</b>		7
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>		9
1.1 Descrição do Agente		9
1.2 Proteínas Virais		11
1.3 Glicoproteína C (gC)		13
1.4 Replicação Viral		14
1.5 Latência		20
1.6 Subtipos de BoHV-1 e BoHV-5		21
1.7 Patogenia		22
1.8 Epidemiologia		26
1.9 Diagnóstico Laboratorial		29
<b>2. OBJETIVOS</b>		32
<b>Capítulo 1.</b> Differentiation between bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis (PCR – REA)		33
<b>Capítulo 2.</b> Phylogenetic analysis of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesvirus (BoHV)1.1, 1.2 and 5		46
<b>Capítulo 3.</b> Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs		63
<b>3. DISCUSSÃO GERAL</b>		71
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		74
<b>ANEXOS</b> – Trabalhos publicados durante o curso de doutorado		86



## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Descrição do Agente

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Membros da família *Herpesviridae* são vírus de tamanho grande (120-300 nm), cujo genoma encontra-se dentro de uma estrutura protéica icosaédrica, o capsídeo. O capsídeo é cercado por uma camada protéica denominada tegumento. Este conjunto é, por sua vez, circundado por um envelope (Figura 1). O envelope apresenta a típica estrutura das membranas de células eucarióticas com a presença de glicoproteínas virais transmembrana (ROIZMAN et al., 2001).

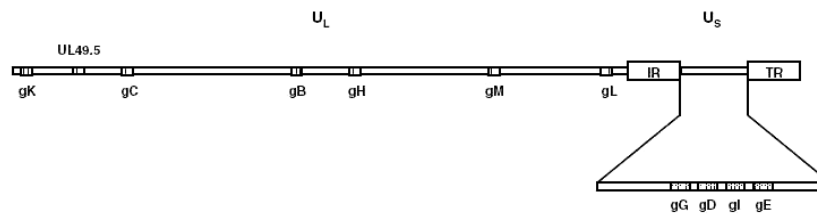


**Figura 1.** Partícula de herpesvírus. C) capsídeo, T) tegumento; E) envelope; G) glicoproteínas (Fonte: Linda Stannard, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town).

Os alfaherpesvírus são taxonomicamente divididos em quatro gêneros, *Simplexvirus*; *Varicellovirus*; *Mardivirus* e *Iltovirus*; apresentam grande variedade de hospedeiros, ciclo de replicação curto (cerca de 12 horas) e capacidade de indução de latência principalmente, mas não exclusivamente, em neurônios (THIRY et al., 2006).

Membros desta subfamília apresentam genoma constituído por uma molécula de DNA linear dupla fita com cerca de 130.000 a 150.000 pares de bases. O genoma viral pode ser dividido em uma região longa (UL) e uma região curta (US) cercada por duas regiões repetidas e invertidas, sendo uma interna (IR) e outra terminal (TR). Tal organização permitiu a inclusão do genoma dos alfaherpesvírus como arranjo típico do grupo “D” (figura 2) (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996) .

Entre os alfaherpesvírus que infectam ruminantes, o protótipo é o BoHV-1, distribuído mundialmente e responsável por uma série de doenças que afetam bovinos de leite ou de corte, com reflexos sobre toda a economia mundial (THIRY et al., 2006).



**Figura 2.** Organização genômica dos alfaherpesvírus (adaptado de Thiry et al., 2006).

O genoma dos alfaherpesvírus consiste em uma molécula dupla fita de DNA, que compreende uma região longa (UL), uma região curta (US) duas regiões repetidas e invertidas uma interna e outra terminal (IR e TR, respectivamente). Em destaque na figura a representação esquemática da localização de várias proteínas. As setas indicam as possíveis orientações de determinados segmentos genômicos.

## 1.2 Proteínas Virais

Os genomas de BoHV-1 e BoHV-5 codificam mais de 70 proteínas (Tabela 1). A maior parte dos genes de BoHV-1 e BoHV-5 apresentam homologia em relação aos genes do vírus do herpes simples humano tipo 1 ou herpesvírus humano tipo 1 (HSV-1 ou HHV-1), assim foram nomeados conforme os genes homólogos do HSV-1. Entre as proteínas codificadas por BoHV-1 e BoHV-5, pelo menos dez são glicoproteínas (SCHWYZER E ACKERMANN, 1996). Destas, enquanto algumas são essenciais à replicação viral tais como gB, gD, gH, gL e gK . Outras (gC, gE, gI, gM e gN), embora desempenhem importantes funções, não são essenciais ao processo de replicação viral (SCHWYZER E 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), bem como muitas são importantes em estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro (HANON et al., 1999; WINKLER et al., 1999; LIMAN et al., 2000).

**Tabela 1.** Proteínas Virais de BoHV-1 (várias amostras) e 5 (amostra SV507), adaptado de Delhon et al., 2003.

Gene	Tamanho (aa)		Identidade (%)	Glicoproteínas
	BoHV-5	BoHV-1		
Circ	245	247	84	K
UL54	403	400	82	
UL53	331	332	85	
UL52	1085	1074	83	
UL51	262	243	81	N
UL50	321	325	83	
UL49.5	95	96	81	
UL49	267	258	72	
UL48	482	505	98	
UL47	741	739	93	
UL46	734	748	82	
UL44	486	508	75	C
UL43	380	378	88	
UL42	412	408	79	
UL41	525	459	91	
UL40	315	314	91	
UL39	800	787	97	
UL38	545	474	87	
UL37	1054	1024	88	
UL36	3204	3247	80	
UL35	125	124	87	
UL34	276	260	83	
UL33	110	108	89	
UL32	598	601	89	
UL31	379	361	84	
UL30	8750	1246	90	
UL29	1208	1203	95	
UL28	816	826	90	
UL27	947	932	93	B
UL26.5	315	308	80	
UL26	619	621	83	
UL25	603	598	94	
UL24	279	293	74	
UL23	356	359	83	
UL22	848	842	86	H
UL21	603	574	77	
UL20	253	231	93	
UL19	1391	1385	97	
UL18	316	316	92	
UL17	707	701	90	
UL16	343	339	93	
UL15	1869	735	95	
UL14	224	222	97	
UL13	495	492	90	
UL12	487	487	88	
UL11	100	89	73	
UL10	419	438	85	M
UL9	823	859	89	
UL8	757	748	89	
UL7	301	299	88	
UL6	820	688	84	
UL5	838	838	99	
UL4	188	185	86	
UL3.5	148	126	69	
UL3	217	204	75	
UL2	298	301	76	
UL1	162	158	81	L
UL0.7	201	97	41	
UL0.5		87		
LRORF2	51	181	82	
LRORF1	360	336	66	
BICP0	720	676	70	
BICP4	1408	1343	75	
BICP22	314	300	68	
US1.67	247	243	79	
US2	226	220	69	
US3	444	468	79	G
US4	440	444	72	D
US6	417	417	98	I
US7	387	382	78	E
US8	599	575	74	
US9	134	144	79	
BICP22	314	300	67	
BICP4	1408	1343	75	

### 1.3 Glicoproteína C (gC)

Embora a gC não seja essencial para multiplicação viral *in vitro* ou *in vivo*, foi demonstrado que ela é importante para a manutenção da eficiência da replicação viral (LIMAN et al., 2000). Além disso, a gC influencia interações imunológicas entre o vírus e o hospedeiro (LIMAN et al., 2002). A gC tem sido descrita como membro da superfamília das imunoglobulinas (FITZPATRICK e BIELEFELDT-OHMANN, 1991), sendo capaz de bloquear a primeira linha do sistema de defesa do hospedeiro através de sua ligação com o terceiro fator (C3) da cascata de Complemento (HUEMER et al., 1993). Assim, ela é capaz de, preferencialmente, interferir com eventos relacionados à resposta imune via Complemento do que com a via de resposta imune tipo MHC (VAN DER MEULEN et al., 2006).

Os genes que codificam as gCs de BoHV-1 e BoHV-5 localizam-se nas regiões UL 43 de BoHV-1 (16683-18209/ Z49224) e UL 44 de BoHV-5 (19051-17591/ Z54206) respectivamente (DELHON et al., 2003). A proteína propriamente dita (gC), é uma das proteínas estruturais não essenciais. É uma proteína transmembrana com cerca de 91 kDa, pertencente à superfamília das imunoglobulinas (FITZPATRICK e BIELEFELDT-OHMANN, 1991; CHOWDHURY, 1997; METTENLEITER, 2003; THIRY et al., 2006). É uma das principais glicoproteínas virais, sendo expressa em altos níveis no envelope viral e na superfície de células infectadas. No vírion, a gC apresenta-se como um dímero de 508 aminoácidos (1572 nucleotídeos) no BoHV-1 e 486 aminoácidos (1464 nucleotídeos) no BoHV-5. As gCs destes vírus compartilham cerca de 75% de similaridade. A região amino-terminal (N-terminal) concentra a maior parte das diferenças entre as gCs de BoHV-1 e BoHV-5, enquanto que as regiões central e carboxi-terminal (C-terminal) apresentam-se bem mais conservadas (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996).

A estrutura secundária da gC de BoHV-1, sugere que esta é composta por sete potenciais domínios estruturais com grande homologia com proteínas da superfamília das imunoglobulinas (Tabela 2) (FITZPATRICK e BIELEFELDT-OHMANN, 1991; CHOWDHURY, 1997). Seu papel principal parece estar ligado à adsorção, atuando como uma das principais glicoproteínas envolvidas neste processo, ligando-se aos receptores de heparina (“Heparan Sulfate Proteoglycan” - HSPG) na superfície das células-alvo (OKAZAKI et al., 1994).

As características acima descritas fazem da gC um potencial alvo para o desenvolvimento de provas de diagnóstico diferencial entre BoHV-1 e BoHV-5 e esta proteína já foi explorada várias vezes no desenvolvimento de técnicas moleculares do tipo reação em cadeia da polimerase (PCR), bem como variações desta técnica (nested PCR, multiplex PCR) para detecção de BoHV-1 ou diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 (VAN ENGELENBURG et al., 1993; VILCEK, 1993; LYAKU et al., 1996; ASHBAUGH et al., 1997; ALEGRE et al., 2001; ESTEVES et al., 2003; CLAUS et al., 2005). Não apenas provas moleculares foram desenvolvidas utilizando-se desta glicoproteína como alvo. A partir da utilização da gC como antígeno, foi possível desenvolver anticorpos monoclonais diferenciais entre BoHV-1.1 e BoHV-1.2, bem como provas tipo ELISA diferenciais entre BoHV-1.1 e 1.2 e BoHV-1 e BoHV-5 (CHOWDHURY, 1997; RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2005).

<b>DOMINIO</b>	<b>RESÍDUOS</b>	<b>FUNÇÃO OU CARACTERÍSTICAS</b>
1°	7-21	Peptídeo sinal.
2°	22-150	Quase 1/3 da porção extracelular, altamente antigênico e provavelmente região imunodominante. Induz formação de anticorpos neutralizantes; hidrofílico.
3°	151-260	Homólogo ao V conjunto da superfamília de imunoglobulinas G (IgG).
4°	261-370	Apresenta homologia ao domínio constante de MHCII, complexa-se com receptores de heparina, hidrofílico.
5°	371-466	Apresenta homologia aos domínios C2 do conjunto de superfamílias de Ig.
6°	467-500	Âncora transmembrana.
7°	501-521	Provável cauda citoplasmática.

**Tabela 2.** Denominação, localização e provável função ou características dos domínios da gC (CHOWDHURY, 1997).

## 1.4 Replicação Viral

O processo de replicação viral de BoHV-1 e BoHV-5 em células permissivas (figura 4) tem como modelo o ciclo de replicação do HSV-1, podendo ser dividido da seguinte forma: 1) adsorção (ligação do vírus a receptores de membrana das células-alvo); 2) fusão do envelope viral com a membrana plasmática das células infectadas e penetração do nucleocapsídeo e tegumento no citoplasma das células infectadas; 3) transporte do nucleocapsídeo e proteínas virais contidas no tegumento ao núcleo das células infectadas; 4) transcrição, replicação e síntese do DNA e proteínas virais respectivamente; 5) montagem e preenchimento dos capsídeos e 6) liberação da progênie infecciosa (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

### 1) Adsorção

Glicoproteínas do envelope viral reconhecem e ligam-se a receptores específicos da membrana celular (BABIUK et al., 1996; MEYER et al., 1998; WILD et al., 1998). Este processo não depende exclusivamente de uma glicoproteína, mas sim da interação de várias glicoproteínas do envelope viral. As principais glicoproteínas envolvidas no processo de adsorção em células epiteliais são a gC e a gB, que reconhecem e ligam-se a receptores celulares de sulfato de heparina (HSPG), seguido da ligação da gB e da gD a outros receptores de membrana. Esta estratégia (denominada redundância, onde uma proteína reconhece mais de um receptor celular) possibilita ao vírus infectar diferentes tipos celulares (*in vivo*, o vírus se depara com pelo menos três tipos de membrana celular: membrana celular de células epiteliais não polarizadas, polarizadas e membranas celulares de neurônios) (BABIUK et al., 1996; IMMERGLUCK et al., 1998; MEYER et al., 1998; METTENLEITER, 2003).

### 2) Fusão e penetração

Pelo menos cinco glicoproteínas estão envolvidas nos processos de fusão e penetração viral às células-alvo: gB, gD, gH, gL e gK (BABIUK et al., 1996; ROIZMAN e KNIPE, 2001). Cerca de 40 segundos após o início da infecção viral foram encontrados alguns vírions parcialmente fusionados à camada mais externa da membrana plasmática. Quarenta e cinco segundos após foi possível observar fusão completa, que resulta numa



inserção parcial do envelope viral à membrana plasmática, com formação de "dobras" na membrana. (WILD et al., 1998).

### **3) Transporte**

Acredita-se que o nucleocapsídeo seja transportado através da ação da glicoproteína VP22 que é responsável pela reorganização do sistema de microtúbulos celulares até o centrômero, perto do núcleo (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

### **4) Transcrição, replicação e síntese**

Os processos de transcrição e replicação do DNA viral ocorrem no núcleo de células infectadas, enquanto a síntese protéica viral dá-se no citoplasma. A transcrição dos genes virais (e conseqüente bloqueio da síntese celular) é regulada temporalmente, havendo três classes de RNAs mensageiros (mRNA), denominadas: "immediate early", ou imediatamente precoces ( $\alpha$ ), "early", ou precoces ( $\beta$ ) e "late", ou tardias ( $\gamma$ ), que são transcritos pela RNA polimerase II (RNAPol II) celular (TIKOO et al., 1995; ROIZMAN e KNIPE, 2001). Os genes  $\alpha$  são os primeiros a serem transcritos. Participam deste processo proteínas do tegumento ( $\alpha$ TIF e VP8), em interação com fatores de transcrição celular sendo, então, 5  $\alpha$ -proteínas denominadas "Bovine Infected Cell Protein" (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27 e BICP47) expressas no início da síntese protéica viral. A síntese das  $\alpha$ -proteínas alcança o nível máximo entre 2 a 4 horas após o início da infecção (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

Uma vez tendo sido produzidas  $\alpha$ -proteínas em volume suficiente, é iniciado o processo de transcrição dos genes  $\beta$ , sendo alcançado o nível máximo de expressão cerca de 5-7 horas após o início da infecção (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

Funcionalmente, as  $\beta$ -proteínas estão envolvidas na regulação da transcrição das  $\alpha$ -proteínas (suprimindo-as), das  $\gamma$ -proteínas (promovendo-as), bem como (juntamente com as  $\alpha$ -proteínas) atuam no processo de replicação do genoma viral. A replicação do DNA viral pode ser detectada cerca de três horas após o início da infecção viral. Este processo conta com a participação das proteínas  $\alpha$  e  $\beta$ , além de proteínas celulares. Nesta fase, o DNA viral pode ser encontrado na forma circular ou linear, havendo indícios de que os

herpesvírus possam replicar seu material genético pelo mecanismo denominado "círculo rolante" (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

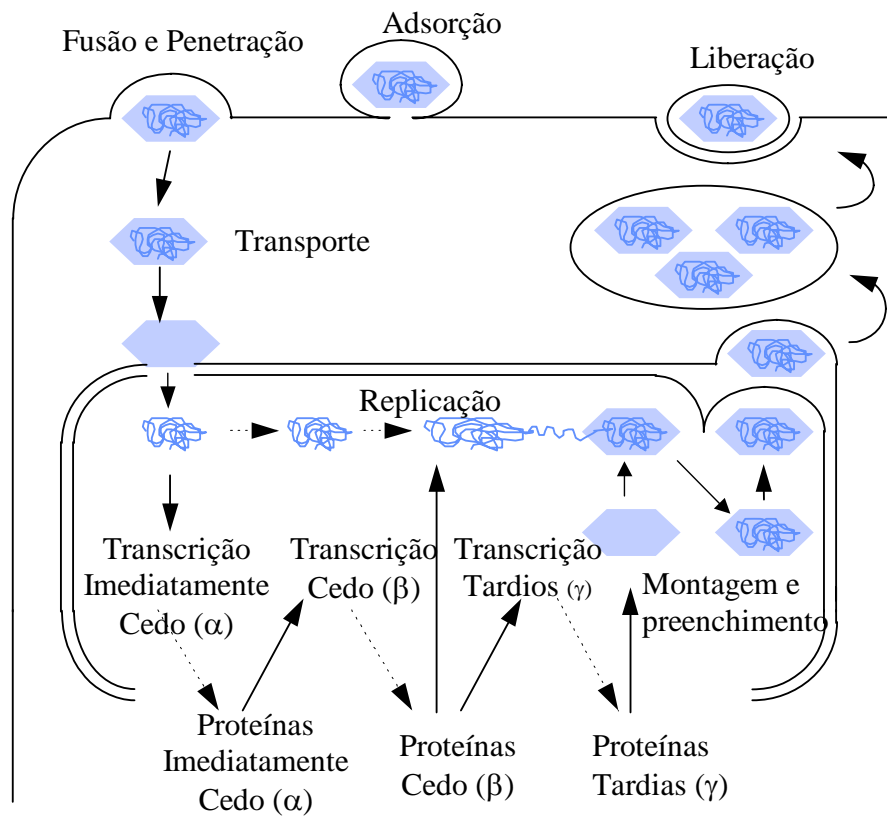
Os genes  $\gamma$  foram, assim como os  $\beta$ , divididos em dois grupos:  $\gamma_1$  (também chamados  $\beta\gamma$ ). Estes genes codificam algumas proteínas tais como: gB, gD, BICP5) e  $\gamma_2$  (que codificam gC, US11) sendo expressos mais tardiamente na infecção. É importante ressaltar que enquanto muitos dos  $\alpha$  e  $\beta$  genes codificam enzimas ou proteínas que complexam-se ao DNA viral, a maioria dos  $\gamma$  genes codificam proteínas estruturais (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

### **5) Montagem e preenchimento dos capsídeos**

A montagem dos capsídeos acontece no núcleo das células infectadas através da interação de determinadas proteínas virais (UL18; UL19; UL35 e UL38). Os capsídeos são preenchidos com as moléculas do DNA viral replicado através do auxílio de várias proteínas virais (UL33; UL32; UL28; UL25; UL15; UL 26.5) (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

### **6) Liberação**

O processo de maturação do capsídeo envolve as etapas de formação do nucleocapsídeo (associação do DNA viral com o capsídeo) e a associação do nucleocapsídeo com áreas da camada interna da membrana nuclear adquirindo, assim, o envelope viral. No citoplasma, vírions acumulam-se dentro de vesículas utilizando-se do Complexo de Golgi para serem secretados para o meio extracelular ou ocorre a dispersão das partículas virais célula-à-célula (METTENLEITER, 2002).



**Figura 3.** Descrição esquemática do processo de replicação dos herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (adaptado de Tikoo et al, 1995).

## 1.5 Latência

Membros da subfamília Alphaherpesvirinae podem estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos, onde o DNA viral pode persistir sob a forma de concatâmeros nos núcleos das células infectadas. Assim, animais latentemente infectados servem de reservatório natural para o vírus durante toda a vida do animal (THIRY et al., 2006).

O vírus pode ser reativado por uma ampla variedade de estímulos imunodepressivos (estresse, transporte, tratamentos com glicocorticóides, parto), sendo a reativação, o fator responsável pela perpetuação e transmissão do vírus no rebanho. A disseminação do vírus no sistema nervoso, a partir de uma infecção primária, ocorre através da penetração via neurônios sensoriais periféricos e transporte dos capsídeos que podem ou não estarem acompanhados por proteínas do tegumento por fluxo axonal retrógrado, usualmente aos gânglios trigêmeo ou sacral (JONES, 2003; METTENLEITER, 2003)

Estudos com o objetivo de determinar as bases moleculares da latência demonstraram que, em contraste aos cerca de 70-80 genes expressos durante o processo de lise, no estágio de latência apenas uma pequena região do genoma (conhecida por genes relacionados à latência – LRG), sobrepostos aos genes  $\alpha$ , é transcrita.

Apenas três transcritos foram detectados durante o período de latência: um de 8,7 kb (em pouquíssima quantidade) e outros dois, de 2 e 1,5 kb (em maior quantidade), no núcleo das células latentemente infectadas (COFFIN et al., 1995; HOSSAIN et al., 1995). Devireddy e Jones (1998) sugeriram que a infecção latente poderia ser dividida em três etapas:

- 1) Estabelecimento da latência: nesta etapa, os transcritos dos LRG (LRGT) sofrem processamento alternativo, sendo traduzidos os fragmentos de 2 ou 1,5 kb (processados a partir do fragmento maior de 8,7 kb).

- 2) Manutenção da latência: aqui o produto de LRGT (LTRP) reprimiria a expressão viral dos genes  $\alpha$ , complexando-se com fatores de transcrição celulares (ciclina A, ciclina E, cdk2, cdc2). Nos neurônios infectados, os LTRP devem neutralizar os efeitos deletérios da ciclina A (necessária para a progressão do ciclo celular e em estágios iniciais de apoptose), bem como de outros fatores virais ou celulares para assegurar a sobrevivência do neurônio e o estabelecimento de latência.

3) Reativação do vírus: nesta fase o fato de ter sido detectada a expressão de RNA de ciclina A durante a reativação, pode indicar que LTRP não conseguem evitar que as células avancem no ciclo celular ou entrem em apoptose, ou ainda, a reativação pode ser um ato de prevenção a uma eminente apoptose celular. Ao final do processo de reativação, o vírion é transportado através dos axônios ao local onde ocorreu a infecção original (JONES, 2003).

### **1.6 Subtipos de BoHV-1 e BoHV-5**

O fato do BoHV-1 estar associado a várias síndromes, como rinotraqueítes, conjuntivites, abortos, vulvovaginites, balanopostites e encefalites, levou os pesquisadores a buscar uma melhor caracterização das amostras isoladas dos diferentes quadros clínicos. Bagust (1972), demonstrou que o herpesvírus bovino causador de encefalites (N569), era um vírus antigenicamente relacionado, mas diferente do BoHV-1 (BAGUST, 1972; METZLER et al., 1985; ENGELS et al., 1986; METZLER et al., 1986; BULACH e STUDDERT, 1990; MAGYAR et al., 1993).

Posteriormente, Ludwig et al (1972) propuseram uma modificação na classificação taxonômica de BoHV-1 baseada nos diferentes quadros clínicos observados. No sistema proposto, as amostras causadoras de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) foram denominadas “assemelhadas às amostras causadoras de IBR” (“IBR-like”) e amostras causadoras de vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) foram denominadas “IPV-like” (LUDWIG, 1972).

Misra et al (1983) e Brake e Studdert (1985) estudaram o genoma de vários isolados de herpesvírus bovinos, constatando diferenças nos perfís de restrição enzimática daquelas amostras. Não foi possível àqueles autores, no entanto, associar os perfís de restrição obtidos com a sintomatologia clínica (MISRA et al., 1983; BRAKE e STUDDERT, 1985).

Mais tarde, com base em análises de perfís de restrição enzimática (REA), Engels et al (1981), propuseram a subdivisão do BoHV-1 em BoHV-1.1 (“IBR-like”) e BoHV-1.2 (“IPV-like”), também referidos como “Cooper-like” e “K22-like” respectivamente (ENGELS et al., 1981).

Friedli e Metzler (1987), demonstraram ser possível diferenciar BoHV 1.1, 1.2 e 1.3 através do uso de anticorpos monoclonais e da análise de proteínas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) (FRIEDLI e METZLER, 1987).

Posteriormente, Whetstone et al (1989) propuseram a divisão em subtipos 1 (ou BoHV-1.1, associado à IBR ou abortos), 2a (BoHV-1.2a, associado a vulvovaginite) e 2b (BoHV-1.2b, associado à balanopostite) e 3 (BoHV-1.3, associado a meningoencefalites) (WHETSTONE e MILLER, 1989).

Baseados nos perfis genômicos através da análise por enzimas de restrição (REA), Bulach e Studdert (1990), estimaram haver uma similaridade genômica de 95% entre a amostra respiratória Cooper e a amostra genital K22 (BoHV-1.2). Em contraste, estimaram uma identidade de 85% entre a amostra Cooper (BoHV-1.1) e a amostra obtida de um caso de meningoencefalite denominada N569 (BoHV-5). Mais tarde, devido a diferenças genômicas, antigênicas e clínico-epidemiológicas observadas, foi proposto que o BoHV-1.3 não fosse mais considerado um subtipo de BoHV-1 e sim alocado em um novo tipo, denominado BoHV-5 (BULACH e STUDDERT, 1990; ROIZMAN et al., 1992).

A seguir, analisando o genoma de diferentes amostras de BoHV-5, d'Offay et al (1993) propuseram a subdivisão de amostras de BoHV-5 em subtipos “a” e “b”, com base nos perfis de restrição enzimática obtidos. Mais recentemente, D'Arce (2002), propôs a existência de um terceiro subtipo de BoHV-5, a que os autores denominaram de amostras “não a, não b” (D'OFFAY et al., 1993; D'ARCE et al., 2002).

## **1.7 Patogenia**

O BoHV-1 é o principal patógeno que afeta bovinos sendo o agente responsável por infecções do sistema respiratório (rinotraqueíte infecciosa bovina – IBR); sistema reprodutivo (balanopostite/ vulvovaginite pustular infecciosa – IPB/ IPV) e diversas outras manifestações clínicas tais como conjuntivite, abortos e ocasionalmente encefalites (d' Offay et al., 1993; Meyer et al., 2001). Embora dados epidemiológicos apontem que amostras de BoHV-1.1 (“IBR-like”) e BoHV-1.2 (“IPV-like”) causem diferentes sintomas clínicos nos animais infectados, ambos podem infectar os tratos respiratório ou genital (RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2004).

Especula-se, contudo, que cada genótipo esteja melhor adaptado a uma determinada localização anatômica; assim, BoHV-1.1 multiplicar-se-ia melhor no trato respiratório, enquanto que BoHV-1.2 multiplicaria-se preferencialmente no trato genital (EDWARDS et al., 1991).

Entretanto, Spilki (2004) ao realizar estudo comparativo de patogenia causada por BoHV-1.1 e BoHV-1.2a descreve que ambos os subtipos induziram igual sintomatologia clínica no trato respiratório de bovinos experimentalmente infectados.

Apesar de compartilharem alta homologia genômica e antigênica BoHV-1 e BoHV-5 são responsáveis por diferentes patogenias (MEYER et al., 2001). Embora o BoHV-1 possa estar esporadicamente associado a casos de encefelite, o BoHV-5 é o principal responsável pela ocorrência de meningoencefalites fatais em bovinos (MEYER et al., 2001). Já o BoHV-5, embora principalmente associado a casos de meningoencefalites não supurativas, pode causar doença respiratória no gado. Além disto, há relatos de isolamento de BoHV-5 a partir de casos de aborto (ELY et al., 1996).

### **1.7.1 Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)**

A IBR pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou severa, podendo atingir 100% de morbidade. Embora incomumente, a mortalidade pode chegar a cerca de 10% . Os sinais clínicos incluem febre, depressão, inapetência, conjuntivite, grande descarga nasal inicialmente serosa e posteriormente mucopurulenta. A mucosa nasal torna-se hiperêmica. As lesões podem ser de difícil visualização, progredindo de pústulas locais a grandes áreas superficiais, hemorrágicas, que podem se apresentar cobertas por uma membrana diftérica. O hálito pode ser fétido, podendo haver dispnéia, respiração pela boca, salivação e um profundo ruído brônquico. Casos agudos podem durar de 5-10 dias (FENNER et al., 1993; MEYER et al., 2001).

### **1.7.2 Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV)**

Vacas afetadas desenvolvem febre, depressão, anorexia, além de micção freqüente e dolorosa. Devido à dor, o animal mantém a cauda um pouco levantada para evitar o contato com a vulva. Os lábios da vulva encontram-se aumentados de volume; há uma leve descarga e a mucosa vestibular fica avermelhada com muitas pústulas pequenas.

Pústulas adjacentes coalescem formando uma pseudomembrana que tende a cobrir a mucosa. O estágio agudo da doença dura cerca de 4 a 5 dias, sendo que as lesões tendem à cura em 10 a 14 dias. Muitos casos são subclínicos (FENNER et al., 1993).

### **1.7.3 Balanopostite pustular infecciosa (IPB)**

Bovinos machos podem cursar IPB de forma clínica ou subclínica. Após um período de incubação de 1 a 3 dias, a mucosa do prepúcio e pênis tornam-se hiperêmicas. Surgem pontos avermelhados que tendem a formar pápulas, vesículas e pústulas. Estas lesões podem coalescer formando placas, úlceras e infecções bacterianas secundárias, resultando em uma descarga prepucial purulenta (VAN OIRSCHOT et al., 1995). Sob condições naturais, bovinos são infectados através dos tratos respiratório ou genital. Há evidências circunstanciais de que após infecções experimentais respiratórias ou intranasais por BoHV-1, seria possível a excreção do vírus através do sêmen (VAN OIRSCHOT, 1995). A IPB pode ser acompanhada por febre, depressão, perda de apetite e uma diminuição da qualidade do sêmen através da redução da mobilidade e anormalidades morfológicas dos espermatozoides (MEYER et al., 2001).

### **1.7.4 Abortos**

O BoHV-1 tem sido apontado como uma causa vírica freqüente de abortos. Contudo, há relatos de amostras caracterizadas como BoHV-5 isoladas diretamente de órgãos internos (baço e fígado) de fetos abortados. Órgãos como útero, ovário e embrião podem sofrer conseqüências diretas de infecção por BoHV-1. O vírus pode atingir estas estruturas por viremia (posterior à primo-infecção ou através de reativação), ou através de sêmen contaminado. Dependendo das estruturas envolvidas e período de gestação, as infecções por BoHV-1 podem determinar quadros de endometrite, ooforite, mortalidade embrionária com retorno ao cio, mortalidade fetal com aborto, mumificação (raramente), natimorto, nascimento de animais fracos e mortalidade neonatal (KAHRS e SMITH, 1965; HEINLEIN et al., 1993; MILLER et al., 1995).



### **1.7.5 Encefalite**

O BoHV-5 é o principal herpesvírus relacionado a casos de meningoencefalites em bovinos. Entretanto, embora mais raramente, o BoVH-1 também pode estar associado a este tipo de manifestação (HEINLEIN et al., 1993; BELKNAP et al., 1994; ELY et al., 1996; ROELS et al., 2000). Segundo trabalhos anteriores envolvendo infecções experimentais em bovinos com BoHV-1 e BoHV-5 revelaram que apenas os animais infectados por BoHV-5 desenvolveram meningoencefalite não supurativa (MEYER et al., 2001). Nos animais que apresentaram encefalite, o DNA de BoHV-5 foi encontrado freqüentemente no gânglio trigêmio, córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo e cerebelo (MEYER et al., 2001; VOGEL et al., 2003).

A doença é caracterizada por tremores, opistótono, cegueira, convulsões, bruxismo, incordenação motora e morte (BELKNAP et al., 1994; MEYER et al., 2001; VOGEL et al., 2003; HÜBNER et al., 2005; SILVA et al., 2006).

## **1.8 EPIDEMIOLOGIA**

### **1.8.1 Situação no mundo**

#### **1.8.1.1. BoHV-1**

O BoHV-1 apresenta distribuição mundial sendo reconhecido como responsável por severas perdas econômicas em rebanhos de corte e de leite (PORTERFIELD, 1989; WEIBLEN et al., 1991; SMITH et al., 1995).

As infecções pelo BoHV-1 apresentam prevalência variada em países da Comunidade Européia. A infecção está em processo de erradicação em alguns países, enquanto outros apresentam prevalências entre 20 e 90% (tabela 3). Áustria, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Suécia e Suíça são países presentemente considerados livres de BoHV-1 (VAN OIRSCHOT et al., 1996).

Na América do Norte, as infecções pelo BoHV-1 são freqüentes e muito prevalentes. Clinicamente, há predomínio da forma respiratória da doença, sendo raras as formas genitais e encefalíticas (OSORIO et al., 1989). Contudo, na América do Sul, estudos sobre prevalência de BoHV-1, têm revelado uma distribuição variada do agente (tabela 4).

#### **1.8.1.2. BoHV-5**

No Hemisfério Sul, o BoHV-5 tem sido isolado de vários surtos de meningoencefalite de curso geralmente fatal, usualmente em bovinos jovens (STUDDERT, 1990; SALVADOR et al., 1998; THIRY et al., 2006). É curioso que os casos de meningoencefalite por BoHV-5 estejam aparentemente concentrados neste hemisfério. A baixa prevalência de encefalites por herpesvirus em países do Hemisfério Norte parece estar, pelo menos em parte, relacionada aos programas de vacinação contra BoHV-1. Reações sorológicas cruzadas entre BoHV-1 e BoHV-5, podem também, mascarar a prevalência de BoHV-5 (BELKNAP et al., 1994; CASCIO et al., 1999; PETZHOLD et al., 2001; THIRY et al., 2006).

CONTINENTE	PAÍS	PREVALÊNCIA (%)	REFERÊNCIA
COMUNIDADE EUROPÉIA	Alemanha	84	VAN WUIJCKHUISE et al.,
	Bélgica	60-90	BOELAERT et al., 2000
	França	20	VAN OIRSCHOT et al., 1996
	Holanda	40	VAN OIRSCHOT et al., 1996
	Hungria	45	RUSVAI e FODOR, 1998
	Inglaterra	50	VAN OIRSCHOT et al., 1996
	Itália	35-39	CASTRUCCI et al., 1997
ÁFRICA	Argélia	39,8	ACHOUR e MOUSSA, 1996
AM. DO NORTE	EUA	50	OSORIO et al., 1989

**Tabela 3.** Prevalência de BoHV-1 em alguns países da Comunidade Européia, América do Norte e África.

PAÍS	CASOS ESTUDADOS	PREVALÊNCIA (%)	TESTE	REFERÊNCIA
ARGENTINA	2140	48	IFI	GALARZA e PERIOLO, 1983
	1930	17		
	1930	68	ELISA	FORT et al., 1996
	1930	30		
CHILE	1512	47	SN	HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1986
COLÔMBIA	2864	41	NI	RIEDEMANN, 1996
	NI	13-16	NI	ZUÑIGA et al., 1978
	NI	50	NI	GRIFFITHS et al., 1983
	797	4		ANDRADE et al., 1967
PERU	2380	43	SN	FONDEVILA et al., 1981
	2380	54		

**Tabela 4.** Prevalência de BoHV-1 na América do Sul. Onde: IFI) Imunofluorescência indireta, ELISA) “Enzyme linked immunosorbent assay”, SN) Soroneutralização, NI) Não informado.

### 1.8.2 Situação no Brasil

No Brasil, BoHV-1 foi isolado pela primeira vez em 1978 por Alice no Estado da Bahia. No Rio Grande do Sul, há relatos de isolamento de BoHV-1 desde 1992 (WEIBLEN et al., 1992) e do BoHV-5 desde 1989 (RIET-CORREA, 1989; WEIBLEN et al., 1989).

No Brasil (assim como em outras partes do mundo) faltam meios para estimar a prevalência real de BoHV-1 e 5 (tabela 5).

REGIÕES	ESTADO	CASOS ESTUDADOS	PREVALÊNCIA (%)	TESTE	REFERÊNCIA
		458	35		GALVÃO et al., 1963
NORTE	BH	2057	74	SN	RIBEIRO, 1982
		1618	11		
CENTRO	GO	NI	66	HA	ANUNCIAÇÃO et al., 1989
	RJ	235	56	SN	GRÉGIO et al., 2000
	RJ	NI	82	HA	ANUNCIAÇÃO et al., 1989
SUDESTE	SP	384	42	SN	MUELLER et al., 1981
		184	50		LANGONI et al., 1995
		532	40	ELISA	TONIN et al., 1996
	SP/MG	235	77		KUNG et al., 1996
	MG	NI	66	HA	ANUNCIAÇÃO et al., 1989
SUL		150	54		MÉDICI et al., 1996
	PR	240	27	ELISA	BARROS FILHO et al., 1997
		7397	51		MÉDICI et al., 2000
		229	33	SN	WIZIGMANN et al., 1972
		526	82	SN	RAVAZZOLO et al., 1989
RS	7956	19		LOVATO et al., 1995	
		2341	32		VIDOR et al., 1995
		1823	29	SN	KRAHL et al., 1997
C.I.A	SP/MG/RS	131	73		PITUCO, 1988

**Tabela 5.** Prevalência de BoHV-1 no Brasil, onde: C.I.A.) Central de inseminação artificial, SN) Soroneutralização, HA) Hemoaglutinação e NI) Não informado

## **1.9 Diagnóstico laboratorial**

### **1.9.1 Diagnóstico virológico**

O diagnóstico virológico de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 é realizado através da identificação de antígenos virais sobre secreções ou tecidos de animais infectados (imunofluorescência direta, imuno-histoquímica), do isolamento do vírus em cultivos celulares ou, ainda, através de métodos moleculares (ROEHE et al., 1997).

O isolamento viral permanece como técnica padrão para a detecção de BoHV-1 e BoHV-5. Para sua execução, suspensões de tecidos ou secreções são inoculadas em sobre cultivos de células, as quais podem ser originárias de cultivos primários ou linhagens celulares contínuas. Após um período variável de incubação, a presença de vírus é detectada pelo efeito citopático (ECP) causado nos cultivos celulares (WEIBLEN et al., 1992; ROEHE et al., 1997).

O diagnóstico rápido buscando a identificação de células contendo antígenos virais em secreções ou tecidos pode ser obtido através das provas de imunofluorescência direta ou imunoperoxidase (IPX). Estes testes dependem essencialmente do tipo de anticorpos empregados para a detecção do antígeno. Se realizados com soros policlonais, provavelmente serão incapazes de diferenciar entre amostras de BoHV-1 e BoHV-5. Contudo, se realizados com anticorpos monoclonais tipo-específicos, poderão ser capazes de diferenciar entre estes vírus (ROEHE et al., 1997).

### **1.9.2 Diagnóstico molecular**

#### **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR tem como objetivo a amplificação de uma região alvo no DNA viral. Apresenta como vantagens o potencial de altos índices de sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução. Foram desenvolvidas diversas variantes da PCR (Nested PCR; Multiplex PCR) para detecção de BoHV-1 e BoHV-5, tendo como regiões-alvo diversas seqüências do genoma destes vírus (VAN ENGELENBURG et al., 1993; WAGTER et al., 1996; FUCHS et al., 1999; ROS et al., 1999; SCHYNTS et al., 1999; ALEGRE et al., 2001; ESTEVES et al., 2003; CLAUS et al., 2005).

### **Análise genômica por restrição enzimática (REA)**

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

### **1.9.3 Diagnóstico sorológico**

Este tipo de diagnóstico pode ser realizado através de uma variedade de técnicas, incluindo: hemaglutinação passiva, fixação do complemento, imunoperoxidase (IPX), imunofluorescência, soroneutralização (SN) e ensaios imunoenzimáticos (KIRBY et al., 1974; GIBBS e RWEYEMAMU, 1977; OSORIO et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1989; SHEN et al., 1991; DEREGT et al., 1993; GRAHAM et al., 1997). Usualmente, na maioria dos laboratórios, o diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1 ou BoHV-5 baseia-se em testes de SN (considerada como método padrão) ou ensaios tipo ELISA (ROEHE et al., 1997).

### **Soroneutralização (SN)**

A SN é considerada a técnica padrão para detecção de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1 (BITSCH, 1978; ROEHE et al., 1997). Entretanto, é uma técnica trabalhosa, dependente da manutenção de um estoque de vírus e de cultivos celulares adequados. Variantes dessa prova tem sido propostas, onde o período de incubação para neutralização do vírus através dos anticorpos pode variar de 1 a 24 horas. O resultado da prova é usualmente obtido em três a cinco dias (BITSCH, 1978). Entretanto, a SN não permite uma diferenciação clara entre animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5. Cerca de 92 % dos animais infectados com BoHV-1 e BoHV-5 apresentam reações cruzadas `a SN, quando a prova é realizada frente a ambos os vírus, ressaltando o alto grau de reatividade cruzada existente entre estes (ROEHE et al., 1998; TEIXEIRA et al., 1998).

### **Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Ensaio imunoenzimático do tipo “ELISA” (do inglês “enzyme linked immunosorbent assay”) são presentemente muito utilizados para diagnóstico sorológico, devido a sua alta sensibilidade, especificidade, capacidade de processamento de grandes número de amostras, relativa facilidade e rapidez de execução. Os reagentes são, em princípio, baratos, estáveis, fáceis de preparar e, geralmente, os resultados de provas tipo ELISA, podem ser quantificados através do uso de um simples espectrofotômetro (BOLTON et al., 1983). No Brasil, o uso de testes de ELISA comerciais tem sido dificultado em função do custo de aquisição dos mesmos. Em função disso, em alguns laboratórios, testes do tipo ELISA produzidos internamente tem sido utilizados (TEIXEIRA et al., 2001; SPILKI et al., 2005).

Atualmente, no comércio mundial, há vários tipos de ELISA disponíveis para diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1 (HERRING et al., 1980; CHO e BOHAC, 1985; EDWARDS e GITAO, 1987; KRAMPS et al., 1994; GRAHAM et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2001; WELLENBERG et al., 2001; KRAMPS et al., 2004); testes específicos para BoHV-5 são mais raros (LINDNER et al., 1993; DUCA et al., 2000), provavelmente porque a importância deste tipo de vírus em países do Hemisfério Norte é bem menor. Dentre estes, dois autores (TEIXEIRA et al., 2001; WELLENBERG et al., 2001) comentam que amostras positivas para BoHV-5 foram analisadas e que reações cruzadas foram detectadas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia de BoHV-1 e 5.

### **2.2 Objetivo Específico**

Através de estudos do gene que codifica a glicoproteína C (gC) de BoHV-1 e BoHV-5, desenvolver ferramentas para diagnóstico laboratorial que possibilitem a diferenciação molecular entre estes dois agentes.



## Capítulo 1

### **Differentiation between bovine herpesvirus types 1 and 5 (BoHV- 1/5) by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis (PCR – REA)**

Esteves, P.A.<sup>1,2</sup>; Silva, A.D.<sup>2</sup>; Spilki, F.R.<sup>3</sup>; Pinto, L.S.<sup>4</sup>; Dellagostin, O.A.<sup>4</sup>; Franco, A.C.<sup>5</sup>; Rijsewijk, F.A.M.<sup>5</sup>; Puentes, R.<sup>6</sup>; Maisonnave, J.<sup>6</sup>; Roehle, P.M.<sup>2,5</sup>

1. Embrapa Suínos e Aves, BR 153 Km 110 CEP.: 89700000, Concórdia/SC  
[pesteves@cnpsa.embrapa.br](mailto:pesteves@cnpsa.embrapa.br) ;
2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV ;
3. Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Biologia – UNICAMP, P.O. Box 6109, 13084-970 Campinas, Brazil;
4. Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia. Pelotas, RS, Brazil;
5. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia dos Solos;
6. Area de Inmunología. Facultad de Veterinaria – Universidad de la República – URUGUAY

**Abstract**

A method for differentiation between bovine herpesvirus types 1 and 5 (BoHV-1 and 5) was developed based on a polymerase chain reaction followed by a restriction enzyme analysis (PCR/REA). The PCR/REA was designed to amplify segments of the less conserved regions on the carboxy-terminal portion of the glycoprotein C (gC) gene, giving rise to amplicons of 575 base pairs (pb) for BoHV- 1.1/ 1.2, and 572 bp for BoHV-5. After digestion with the *Bgl* I restriction enzyme while the BoHV-1 amplicons were not digested, the BoHV-5 amplicons were separated in two smaller fragments (239 and 333 base pair) allowing the differentiation between BoHV-1 and 5. Twenty eight BoHV isolates and alphaherpesviruses of other species were examined in order to validate the assay. Although a more extensive comparison is needed, we conclude that the PCR assay described here may be a good alternative for an differential detection of BoHV-1 or BoHV-5.

*Key words:* BoHV-1; BoHV-5; Polymerase chain reaction; Restriction enzyme analysis; glycoprotein C.

## Introduction

Bovine herpesvirus (BoHV) type 1 (BoHV-1), and its subtypes 1 and 2 (BoHV-1.1 and BoHV-1.2), as well as BoHV type 5 (BoHV-5) are members of the *Herpesviridae* family, subfamily *Alphaherpesvirinae*. BoHV virions contain a genome composed by approximately 135,000 base pairs (bp) of double stranded DNA that codes about 70 to 100 proteins (Roizman e Knipe, 2001; Delhon et al., 2003; Thiry et al., 2006a). Whereas BoHV-1.1 and BoHV-1.2 are often associated to infections of the respiratory and genital tracts, BoHV-5 is usually associated to fatal meningoencephalitis occurring mainly in young animals (Carrilo et al., 1983; Salvador et al., 1998). However, such association is not absolute since, occasionally, both BoHV-1.1 and BoHV-1.2 may be associated to respiratory tract disease (D'Arce et al., 2002). Yet some BoHV-1.2 isolates may cause severe respiratory illness under experimental conditions (Spilki et al., 2004).

BoHV-1 subtypes (1.1 and 1.2) share extensive genomic homology. Nucleotide identity between subtypes is around 98% whereas between the two virus types (1 and 5) the nucleotide homology is about 85% (Metzler et al., 1985; Engels et al., 1986). Such degree of similarity reflects results in the extensive serological cross reactions detected between the two virus types (Brake e Studdert, 1985; Metzler et al., 1985; Metzler et al., 1986; Engels et al., 1987). Despite such high homology, BoHV-1 and BoHV-5 bear differences along the genome which may be useful for type/subtype specific differentiation (Ashbaugh et al., 1997; Alegre et al., 2001; Claus et al., 2005; Spilki et al., 2005). One of such regions is the glycoprotein C (gC) gene which; in view of its high degree of variability along its N-terminal region, has often been envisaged as a target for the development of type-differential tests (Chowdhury, 1995; Wellenberg et al., 2001; Spilki et al., 2005). Here, a method to differentiate BoHV types 1 and 5 by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis (PCR – REA) is described.

## Materials and methods

### *Cells and virus*

Madin Darby bovine kidney (MDBK) cells were grown in Eagle's essential medium (EMEM, Gibco BRL, USA) supplemented with 5 to 10% of fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA), antibiotics and amphotericin B (Sigma). These cells were used for all virus isolation (if necessary), multiplication and titration procedures carried out in this study. BoHV-1 and 5 field isolates and standard strains used are listed in table 1.

The specificity of the PCR was verified with different viruses, including equine herpesvirus 1 (EHV-1), canine herpesvirus (CaHV-1), bovine viral diarrhea virus (BVDV), feline herpesvirus type 1 (FHV-1), pseudorabies virus (PRV) and cervine herpesvirus (CerHV). These were obtained from the stocks of the Virology section of the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF).

### *Viral DNA extraction*

Total DNA was extracted from viral suspensions as previously described (Vilcek et al., 1994) with small modifications. Samples (0.5 mL) of BoHV-1 infected cells suspended in culture medium were incubated with 15 µL of sodium dodecyl sulfate (SDS 10%) and 5 µL of proteinase K (20 mg/mL) for 60 min at 37 °C. The solution was then extracted with one volume of phenol (pH 8.0) and centrifuged for 3 min at 14000 x g. The aqueous fraction was transferred to a 1.5 mL tube and mixed with an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1). After another centrifugation step (3 min, 14000 x g), the DNA was precipitated with 2 volumes of cold ethanol and 0.3 M NaCl for 30 min at -20 °C, centrifuged at 14000 x g for 20 min. The pellet obtained was rinsed with 1 mL of 70% ethanol, dried and resuspended in 30 µL of ultrapure water and stored at -20 °C until use. The DNA concentration and purity were determined with a spectrophotometer (Pharmacia LKB Biochrom Ltd., United Kingdom).

### *Polymerase chain reaction*

The primers used in the PCR assays were designed based on the gC gene sequences of both BoHV-1 and BoHV-5 available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Primers forward (PF 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3') and reverse (PR 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3') were designed to target a 575 / 572 bp fragment on BoHV-1 and 5 (nucleotides 873-1447 and 813-1384 from sequences accession numbers Z49223 and Z49224 respectively).

Amplification reactions were performed in a thermocycler (Mastercycler Eppendorf) under the following conditions: a denaturation step of 1 minute at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C (denaturation); 1 min at 60 °C (annealing); 1 min at 72 °C (extension) and one last extension step of 5 min at 72 °C. The products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), and visualized under UV light. The size of the amplified products was determined by comparison with a 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

### *Sensitivity and specificity of the PCR*

To evaluate the sensitivity of the assay, series of 10-fold dilutions of purified viral DNA were used. The specificity of the PCR was demonstrated by attempting to amplify DNA from equine herpesvirus type 1 (EHV-1), canine herpesvirus (CaHV-1), bovine viral diarrhea virus (BVDV), feline herpesvirus type 1 (FHV-1), pseudorabies virus (PRV) and cervine herpesvirus (CerHV).

### *Restriction enzyme analysis (REA)*

The amplicons obtained in the PCR reactions were purified using the GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences) for further enzymatic digestions. The reactions were performed using 80 to 100 ng of the purified PCR product. In order to differentiate BoHV-1 from BoHV-5 the amplicons were digested with *Bgl* I (New England Biolabs) restriction enzyme. The products of the digestion reactions were submitted to electrophoresis on 1 % agarose gels and visualized as described for analysis of PCR amplicons.

## Results

### *Specificity and Sensitivity of the PCR*

The designed PCR amplified DNA from all strains of BoHV-1 (1.1, 1.2) and BoHV-5 here tested (figure 1). To examine the specificity of the PCR, seven related herpesvirus strains were tested. After the PCR no specific products could be detected from these related viruses. Also, when 1 µg of salmon sperm DNA or DNA derived from MDBK cells non-infected were tested, no specific products were obtained. These results indicated that this PCR was specific for BoHV-1.1; 1.2 and 5.

To determine the sensitivity of the PCR, 10-fold dilutions of purified BoHV-1 DNA were submitted to amplification. As few as seventeen molecules of BoHV-1 were amplified, and the products were easily visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel (figure 2).

### *Restriction enzyme analysis (REA)*

Cleavage patterns generated by digestion with *Bgl* I allowed the differentiation between BoHV-1 and 5 (figure 3). As the BoHV-5 amplicon has a site for *Bgl* I at position 239 nct, the digestion of the BoHV-5 amplicon generated two fragments (239 bp and 333 bp) (figure 3). The *Bgl* I site is located at the position 1045-1055 in the BoHV-5 gC gene sequence (accession number Z49224). Isolates of BoHV-1, in the other hand showed one base change (C→G) at the position 1106 of the gC gene sequence (accession number Z49223). This change impaired the cleavage by *Bgl* I digestion enzyme at site 1105-1115 in the BoHV-1 gC gene sequence (accession number Z49223).

## Discussion

Until the beginning of the eighties, BoHV-1 was understood as the responsible for such differentials like infectious bovine rhinotracheitis (IBR); infectious pustular vulvovaginitis/ balanopostitis (IPV/ IPB); abortions; conjunctivitis and rarely encephalitis, based almost exclusively in the viral antigenic properties (Gibbs and Rweyemamu, 1977). Further studies, however, start to change this concept. With the advent of the molecular techniques together with the previously antigenic knowledge, it was possible to investigate the molecular characterization of BoHV-1 and the virus was then classified in very related but distinct types and subtypes, each one more closely related with certain types of syndromes. BoHV-1 was divided in subtypes (1.1; 1.2 a/b and 1.3 a/b). Subtypes 1.1 and 1.2 were usually associated (though not exclusively) with clinical signs in the respiratory and genital tract. Subtype 1.3 was usually related to cases of meningoencephalitis (Engels et al., 1981; Mayfield et al., 1983; Engels et al., 1986). Later, the encephalitic BoHV-1.3 isolates were considered distinct enough to warrant status of a new type; subtype 1.3 was then renamed and reclassified as BoHV-5 (Roizman et al., 1992).

Despite the clinical, antigenic and molecular differences BoHV-1 and BoHV-5 are very closely related, sharing (on average) 82% of amino acid identity (Delhon et al., 2003). As BoHV-1 is distributed worldwide and BoHV-5 seems to occur mainly in the regions where control of BoHV-1 infections is scarce or non-existent, this high antigenic homology is responsible for the lack of information on the actual distribution of BoHV-5 (Roehle et al., 1997).

In order to develop a technique for differential detection of BoHV-1 and 5 is an important strategy search into the viral genome regions with lower degree of homology between these viruses. The glycoprotein C (gC) is an important but not essential envelope viral protein that shows a relative low degree of homology between BoHV-1 and 5 (75%). This makes the gC an important target in the development of assays aimed at the differential detection of these viruses.

In recent years different reports have been published describing PCR methods for detection of BoHV-1 (van Engelenburg et al., 1993; Vilcek et al., 1993), or to differentiate

BoHV-1 to BoHV-5 (Ashbaugh et al., 1997; Ros et al., 1999; Moore et al., 2000; Alegre et al., 2001; Esteves et al., 2003; Claus et al., 2005).

With the aim to provide a method to differentiate between BoHV-1 and 5 and thus contribute to a better understanding of the epidemiology of these infections in cattle, the present work was carried out to develop a PCR/REA applicable in the differential diagnosis of BoHV-1 and 5.

For that, the carboxy-terminal region of the gC gene was targeted for PCR amplification and REA analysis (PCR/REA). An amplicon of 575 or 572 bp on BoHV-5 was digested with restriction enzyme *Bgl* I for differentiation between the two virus types BoHV-1 or 5. After digestion, it was possible to differentiate between BoHV-1 and 5. The PCR/ REA proved to be a useful tool for differentiating these two virus types.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq and CAPES. Roehle, PM is a CNPq research fellow.



## References

- Alegre, M.; Nanni, M.; Fondevila, N. (2001). "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 **48**(8): 613-21.
- Ashbaugh, S. E.; Thompson, K. E.; Belknap, E. B.; Schultheiss, P. C.; Chowdhury, S.; Collins, J. K. (1997). "Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction." J Vet Diagn Invest **9**(4): 387-94.
- Brake, F. and Studdert, M. J. (1985). "Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus." Aust Vet J **62**(10): 331-4.
- Carrillo, B. J.; Ambroggi, A.; Schudel, A. A.; Vazquez, M.; Dahme, E.; Pospischil, A. (1983). "Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina." Zent Vet B **30**(5): 327-32.
- Chowdhury, S. I. (1995). "Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5." Virology **213**(2): 558-68.
- Claus, M. P.; Alfieri, A. F.; Folgueras-Flatschart, A. V.; Wosiacki, S. R.; Medici, K. C.; Alfieri, A. A. (2005). "Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR." J Virol Methods **128**(1-2): 183-8.
- D'Arce, R. C.; Almeida, R. S.; Silva, T. C.; Franco, A. C.; Spilki, F.; Roehe, P. M.; Arns, C. W. (2002). "Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5." Vet Microbiol **88**(4): 315-24.
- Delhon, G.; Moraes, M. P.; Lu, Z.; Afonso, C. L.; Flores, E. F.; Weiblen, R.; Kutish, G. F.; Rock, D. L. (2003). "Genome of bovine herpesvirus 5." J Virol **77**(19): 10339-47.
- Engels, M.; Steck, F.; Wyler, R. (1981). "Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis." Arch Virol **67**(2): 169-74.
- Engels, M.; Loepfe, E.; Wild, P.; Schraner, E.; Wyler, R. (1987). "The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1." J Gen Virol **68** ( Pt 7): 2019-23.
- Engels, M.; Giuliani, C.; Wild, P.; Beck, T. M.; Loepfe, E.; Wyler, R. (1986). "The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization." Virus Res **6**(1): 57-73.
- Gibbs, E. P. J. and Rweyemamu, M. M. (1977). "Bovine herpesvirus. Part I. bovine herpesvirus 1." The Vet Bull **47**: 317-343.
- Madin S.H., York C.J. & McKercher D.G. (1956). "Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus." Science **124**:721-722.
- Mayfield, J. E.; Good, P. J.; VanOort, H. J.; Campbell, A. R.; Reed, D. E. (1983). "Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain)." J Virol **47**(1): 259-64.

- Metzler, A. E.; Schudel, A. A.; Engels, M. (1986). "Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease." Arch Virol **87**(3-4): 205-17.
- Metzler, A. E.; Matile, H.; Gassmann, U.; Engels, M.; Wyler, R. (1985). "European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies." Arch Virol **85**(1-2): 57-69.
- Roizman, B. and Knipe, M. D. (2001). Herpes simplex virus and their replication. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins publishers.
- Roizman, B.; Desrosiers, R. C.; Fleckenstein, B.; Lopez, C.; Minson, A. C.; Studdert, M. J. (1992). "The Family Herpesviridae: an up date." Arch Virol **123**: 425-448.
- Salvador, S. C.; Lemos, R. A. A.; Riet-Correa, F.; Roehe, P. M.; Osório, A. L. (1998). "Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo." Pesq Vet Bras **18**: 76-83.
- Spilki, F. R.; Esteves, P. A.; da Silva, A. D.; Franco, A. C.; Rijsewijk, F. A.; Roehe, P. M. (2005). "A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2)." J Virol Methods **129**(2): 191-3.
- Spilki, F. R.; Esteves, P. A.; Lima, M.; Franco, A. C.; Chiminazzo, C.; Flores, E. F.; Weiblen, R.; Driemeier, D.; Roehe, P. M. (2004). "Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a)." Pesq Vet Bras **24**(1): 43-49.
- Thiry, J.; Keuser, V.; Muylkens, B.; Meurens, F.; Gogev, S.; Vanderplasschen, A.; Thiry, E. (2006). "Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1." Vet Res **37**(2): 169-90.
- Vilcek, S. (1993). "Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR." J Virol Methods **41**(2): 245-7.
- Wellenberg, G. J.; Mars, M. H.; Van Oirschot, J. T. (2001). "Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA." Vet Microbiol **78**(1): 79-84.

## Tables and figures

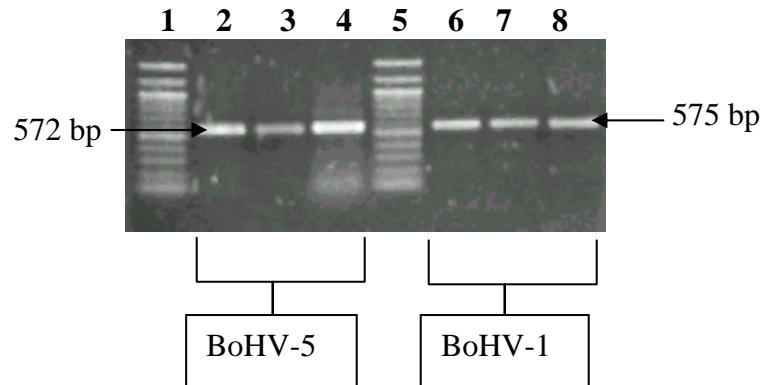
**Table 1.** Bovine herpesviruses used in the present study.

Virus	Classification	Clinical Signs	Country/ State	Reference/ Origin
1 Los Angeles (LA)	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	USA	Madin et al., 1956
2 Cooper	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	USA	Madin et al., 1956
3 Lam	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	HOL	Van Engelenburg et al. 1994
4 T3	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	URU	FVURU <sup>1</sup>
5 UY1999	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	URU	FVURU
6 UY2002	BoHV-1.2	Rhinotracheitis	URU	FVURU
7 UY2004	BoHV-1.2	Rhinotracheitis	URU	FVURU
8 SV265/96	BoHV-1.2	Rhinotracheitis	BRA/RS	UFMS <sup>2</sup>
9 EVI123/98	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
10 EVI14/94	BoHV-1.2	Abortion	BRA/RS	Souza et al., 2002
11 EVI1779	BoHV-1.2	Abortion	BRA/RS	IPVDF <sup>2</sup>
12 PG2560	BoHV-1.1	Abortion	BRA/RS	IPVDF
13 A663	BoHV-5	Encephalitis	ARG	Carrillo et al., 1983
14 N569	BoHV-5	Encephalitis	AUS	French, 1962
15 T2	BoHV-5	Encephalitis	URU	FVURU
16 AA05	BoHV-5	Encephalitis	BRA/MS	Souza et al., 2002
17 EVI88/95	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
18 EVI99	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
19 EVI100	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
20 EVI340/96	BoHV-5	Encephalitis	BRA/MS	Souza et al., 2002
21 SV136	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
22 SV507	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Delhon et al., 2003
23 Taim	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
24 ISO45/97	BoHV-5	Encephalitis	BRA/MG	Souza et al., 2002
25 ISO87/97	BoHV-5	Encephalitis	BRA/SP	Souza et al., 2002
26 P160/96	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RJ	Souza et al., 2002
27 RP	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
28 V175	BoHV-5	Semen	BRA/RS	Esmeraldino et al., 1996

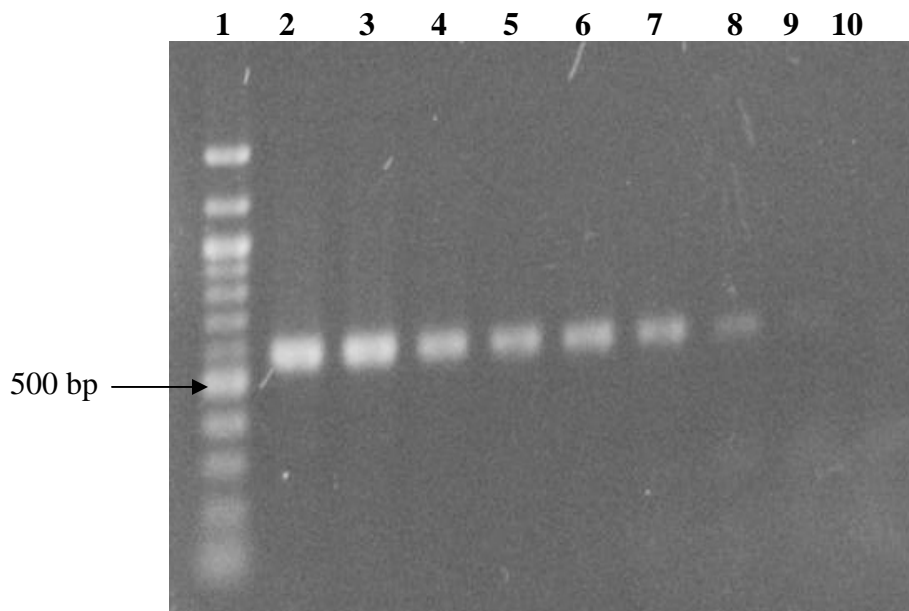
1. Universidad de la República/ Uruguay

2. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor/ Rio Grande do Sul/ Brazil

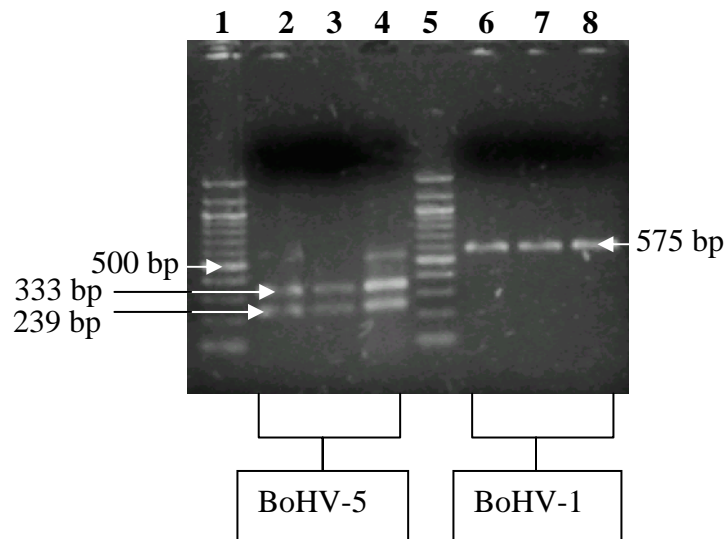
**Figure 1.** Ethidium bromide stained 1% agarose gel electrophoresis of the amplified products by PCR for BoHV-1 (574 bp) and BoHV-5 (571 bp) glycoprotein C gene. Lanes: 1,5) Marker ladder 100 pb; 2) EVI 88/BoHV-5; 3) A663/BoHV-5; 4) N569/BoHV-5; 6) PG 2560/BoHV-1.1; 7) EVI 1779/BoHV-1.2; 8) LA/BoHV-1



**Figure 2.** Determination of the sensitivity of PCR. Products obtained from a 10 fold dilutions series of viral DNA were analyzed on 1 % ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis. Lanes: 1) Marker Ladder 100 pb; 2)  $10^{-1}$ ; 3)  $10^{-2}$ ; 4)  $10^{-3}$ ; 5)  $10^{-4}$ ; 6)  $10^{-5}$ ; 7)  $10^{-6}$ ; 8)  $10^{-7}$ ; 9)  $10^{-8}$ ; 10-fold dilutions of viral DNA BoHV-1; 10) Negative control.



**Figure 3.** Restriction Endonuclease Analysis of the PCR products digested with *Bgl*I restriction enzyme. Lanes: 1,5) Marker Ladder 100 pb; 2) EVI 88/BoHV-5; 3) A663/BoHV-5; 4) N569/BoHV-5; 6) PG 2560/BoHV-1.1; 7) EVI1779/BoHV-1.2; 8) LA/BoHV-1.



## Capítulo 2

### **Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesvirus (BoHV) 1.1, 1.2 and 5**

Esteves, PA<sup>1,2</sup>; Silva, AD<sup>2</sup>; Spilki, FR<sup>3</sup>; Pinto, LS<sup>4</sup>; Dellagostin, OA<sup>4</sup>; Hübner, SO<sup>4</sup>; Puentes, R<sup>5</sup>; Maisonnave, J<sup>5</sup>; Franco, AC<sup>6</sup>; Rijsewijk, FAM<sup>6</sup>; Batista, HBCR<sup>2</sup>; Teixeira, TF<sup>2</sup>; Dezen, D<sup>2</sup>; Oliveira, AP<sup>6</sup>; Arns, CW<sup>3</sup>; Roehe, PM<sup>2,6</sup>

5. Embrapa Suínos e Aves, BR 153 Km 110 CEP.: 89700000, Concórdia/SC  
[pesteves@cnpsa.embrapa.br](mailto:pesteves@cnpsa.embrapa.br) ;

6. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV

7. Universidade de Campinas,

8. Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia. Pelotas, RS, Brazil.

5. Area de Inmunología. Facultad de Veterinaria – Universidad de la República – URUGUAY

6. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Microbiologia dos Solos;

**Abstract**

Different types and subtypes of BoHV-1 and BoHV-5 have been associated to different clinical conditions of cattle, in such a way that type/subtype differentiation has become an essential tool for understanding pathogenesis and epidemiology of BoHV infections in cattle. However, currently available methods for type/subtype differentiation are complicated by cross-reactions between these two virus types. In search for a region that would allow a clear distinction between BoHV-1 and 5, the carboxy-terminal portion of glycoprotein C (gC), corresponding to residues 321 - 450 (BoHV-1) and 301 - 429 (BoHV-5) of 23 South American isolates was amplified and sequenced. The nucleotide sequence alignments revealed identity ranged from 98,7 to 99,8% (BoHV-1/ BoHV-1), 88,3 to 92% (BoHV-1/ BoHV-5) and 96 to 99,7% (BoHV-5/ BoHV-5) strains/isolates. The identity deduced from amino acid sequences ranged from 97,5 to 99,5% (BoHV-1/ BoHV-1), 77,5 to 84,4% (BoHV-1/ BoHV-5) and 92,1 to 99,5% (BoHV-5/ BoHV-5). Phylogenetic analyses and deduced amino acid sequences revealed that: i) some BoHV-5 isolates (ISO45 and ISO87) seems to be “non a non b” subtype and ii) The Uruguayan strain (UY2002) has a distinct nucleotide and amino acid sequence when compared to others BoHV-1.2 strains.

*Key words:* Bovine herpesvirus type 1; Bovine herpesvirus type 5; Phylogenetic analysis.

## Introduction

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are members of *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily, *Varicellovirus* genus. According to antigenic and genomic characteristics BoHV-1, was previously divided in two distinct very closely related subtypes named BoHV-1.1 and BoHV-1.2 (Metzler et al., 1986; Miller et al., 1991; Roizman et al., 1992). Despite that, they have been associated to distinct manifestations of disease in cattle (Engels et al., 1992). While BoHV-1.1 can cause respiratory tract infections known as infectious bovine rhinotracheitis (IBR), BoHV-1.2 and its variants, known as “BoHV-1.2a” and “BoHV-1.2b”) are associated with infections of the reproductive tract, a disease named infectious pustular vulvovaginitis/balanopostitis (IPV/IPB) (Metzler et al., 1986; Miller et al., 1991). However, BoHV-1.2a strains may induce clearly noticeable disease in calves under natural and experimental inoculations (D'Arce et al., 2002; Spilki et al., 2004). Although epidemiological data strongly suggest that BoHV-1.1 and 1.2 strains differ in their clinical effects, it is difficult to determine the precise biological differences between the two viruses (Rijsewijk et al., 1999; Spilki et al., 2004). Both subtypes are able to infect respiratory and genital tract of cattle, however, it has been suggested that each genotype is better adapted to either respiratory (BoHV-1.1) or genital (BoHV-1.2) tract (Edwards et al., 1991; Rijsewijk et al., 1999; Spilki et al., 2004).

Meanwhile, BoHV-5 is responsible for a severe non-suppurative meningoencephalitis in young calves (Meyer et al., 2001; Delhon et al., 2003). It may also be found infecting the genital tract of cattle (Esteves et al., 2003; Gomes et al., 2003). As in BoHV-1.2, different strains of BoHV-5 were previously named “BoHV-5a”; “BoHV-5b” and “BoHV-5 non a non b”, according to molecular and/or antigenic characteristics (D'Arce et al., 2003; Rijsewijk et al., 1999).

Despite of the high degree of similarity between BoHV-1.1; BoHV-1.2 and BoHV-5, there are genomic regions of these viruses that can be used for the development of new differential diagnostic tests (Alegre et al., 2001; Esteves et al., 2003; Claus et al., 2005; Spilki et al., 2005). BoHV glycoprotein C (gC) is inserted into the viral envelope; it is a nonessential type I transmembrane protein that belongs to the immunoglobulin superfamily (Fitzpatrick et al., 1989). It is a dimeric glycoprotein that consists of 521 (BoHV-1) and 471 (BoHV-5) amino acid (aa) residues (Fitzpatrick et al., 1989; Chowdhury et al., 1997).



In order to compare the degree of identity between different strains of BoHV-1.1; BoHV-1.2 and BoHV-5, we carried out amplification, sequencing and phylogenetic analysis the carboxy-terminal regions comprising amino acids 321 to 450 (on BoHV-1) and 301 to 429 (on BoHV-5) of the gC gene from 23 South American BoHV-1.1, BoHV-1.2 and BoHV-5 isolates.

## Material and methods

### Cells and virus

Virus multiplication, quantitation and isolation from tissues were performed on Madin Darby bovine kidney cells (MDBK, ATCC, CCL-22). Cells were routinely maintained in Eagle's minimal essential medium (E-MEM) supplemented with 6 % foetal calf serum (FCS, Nutricell) and 2 mg/L enrofloxacin (Baytril, Bayer). Cells were maintained and multiplied following standard procedures (Roehle et al., 1997).

The virus strains /isolates used in the study are shown in table 1, with the exception of the sequence of the pseudorabies virus (PrV) and the sequences of the glycoprotein C of the Bovine herpesvirus types 1 and 5 (GenBank accession numbers AF403051, Z49223, and Z49224 respectively), included for comparisons.

### *Viral DNA extraction*

Total DNA was extracted from viral suspensions as previously described (Vilcek et al., 1994) with small modifications. Samples (0.5 mL) of BoHV- infected cells suspended in culture medium were incubated with 15  $\mu$ L of sodium dodecil sulfate (SDS 10%) and 5  $\mu$ L of proteinase K (20 mg/mL) for 60 min at 37 °C. The solution was then extracted with one volume of phenol (pH 8.0) and centrifuged for 3 min at 14000 x g. The aqueous fraction was transferred to a 1.5 mL tube and mixed with an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1). After another centrifugation step (3 min, 14000 x g), the DNA was precipitated with 2 volumes of cold ethanol and 0.3 M NaCl for 30 min at -20 °C, centrifuged at 14000 x g for 20 min. The pellet obtained was rinsed with 1 mL of 70% ethanol, dried and resuspended in 30  $\mu$ L of ultrapure water and stored at -20 °C until use. The DNA concentration and purity were determined with a spectrophotometer (Pharmacia LKB Biochrom Ltd., United Kingdom).

### *Polymerase chain reaction*

The primers used in the PCR assays were designed based on the gC gene sequences of both BoHV-1 and BoHV-5 available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Primers forward (PF 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3') and reverse (PR 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3') were designed to target a 575 / 572 bp fragment on

BoHV-1 and 5 (nucleotides 873-1447 and 813-1384 from sequences accession numbers Z49223 and Z49224 respectively). Amplification reactions were performed in a thermocycler (Mastercycler Eppendorf) under the following conditions: a denaturation step of 1 minute at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C (denaturation); 1 min at 60 °C (annealing); 1 min at 72 °C (extension) and one last extension step of 5 min at 72 °C. The products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), and visualized under UV light. The size of the amplified products was determined by comparison with a 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

#### Sequencing and Sequence analysis

Genomic DNA amplified was purified using GFX PCR and Gel DNA purification kit (GE Healthcare, Giles, United Kingdom). The quality of all DNA preparations was checked in agarose gel electrophoresis (Sambrook et al., 2001). Sequencing was carried out with the DYEnamic ET terminators sequencing kit (GE Healthcare, Giles, United Kingdom) following the manufacturer's protocol. Sequence determination was performed in a MegaBACE 500 automatic sequencer (GE Healthcare). Each product was sequenced four times in both directions using primers PF and PR described above.

The quality of DNA sequences was checked and overlapping fragments were assembled using the BioEdit package 7.0.5 (Hall, 1999), Vector NTI 8.0, AlignX and ContigExpress (InforMax, Inc.). Assembled sequences with high quality were aligned using CLUSTALX (Thompson et al., 1994) with default gap penalties. Homologies analyses were performed with the NCBI database and BLAST (Altschul et al., 1997).

The BioEdit software, version 7.0.5 (Hall, 1999), was used to manipulate the amino acid sequences retrieved. The sequence alignments were performed using the ClustalW software, version 1.83 (Thompson et al., 1994), using full alignment and a number of 2000 total replications on the bootstrap, in order to ensure a higher level of confidence to our analysis (Efron et al., 1996). Phylogenetic relationships between these protein sequences were performed at MEGA 3 (Kumar et al., 2004), neighbour joining trees were constructed from Kimura-2 parameters and calculated using pairwise deletion. Bootstrap was resampled as a test of phylogeny using 250 replications.

## Results

### Nucleotide and deduced amino acid sequences

In this study the gC gene from BoHV-1 and BoHV-5 were partially sequenced. The lengths of the sequenced regions varied between 388 to 567 nucleotides. A consistent alignment provided by 388 nucleotides in gC gene (figures 1 and 5) revealed high degrees of identity in all herpesvirus analyzed in the study. The phylogenetic tree inferred by the gC nucleotide sequence by the neighbor-joining method (figure 2) allowed the grouping of the viruses according in their different types or subtypes according previously reported (Metzler et al., 1986; Miller et al., 1991; Souza et al., 2002).

The phylogenetic analysis showed the BoHV-5 isolated from South America grouped together while the Australian reference strain N569 was located in a distinct branch (figure 2). Nucleotide analysis revealed that two BoHV-5 isolates (ISO 87 and ISO 45) seem to form a subgroup different from BoHV-5 a/b subtypes as suggested by D'Arce et al., 2002. The isolated SV507 was clustered together with the South Americans BoHV-5 strains but due some differences in this sequence was located between the ISO and the others BoHV-5 South American isolates.

In the same analysis (figure 2) the strains of BoHV-1 were grouped in two different clusters, one related to BoHV-1.1 and another to BoHV-1.2. The BoHV-1.2 isolates from SA were grouped together with exception the isolate Uy2002. This observation is in agreement to previous work (Puentes et al., 2005) that noted a different RFLP profile from these viral strain from Uruguay.

The figure 3 showed the differences founded in the aminoacid sequenced alignment. The tree constructed on the bases of the aminoacid sequences (figure 4) showed a similar topography found in the nucleotide based tree. This tree showed the presence of two groups, one formed by BoHV-1 (1.1 and 1.2) strains and one by BoHV-5. In this analysis the Australian strain N569 was located separately from the South Americans BoHV-5 isolates.

## Discussion

The aim of the present study was increase our understanding about the genetic relatedness of bovine alphaherpesviruses (BoHV-1.1; 1.2 and 5) isolated in South America/ SA (mostly from Brazil), based on the analysis of the carboxy-terminal region of the gC gene. Comparison of 388 nucleotides sequences revealed a highly conserved region in all viruses studied here. The phylogenetic analysis showed a consistent grouping (supported by high bootstrap values) of the different subtypes of BoHV-1 and 5. The nucleotide analysis showed that BoVH-5 isolated from SA were more closely related than to Australian N569 strain (figures 2, 4 and 5).

The strains of 1.1 isolated from USA; EU and SA were grouped together, separately from strain of subtype 1.2. It's interesting noted that there is a strain of BoHV-1.2 from Uruguay (Uy 2002) was grouped separated from others 1.2 strains analyzed. These particularly isolated was previously refereed by Puentes (2005) as an atypical BoHV-1.2, with different RFLP pattern. However the Uruguayan BoHV-1.1 strains Uy 1999 and T3 has the same pattern founded in the strains of BoHV-1.1 from North Hemisphere.

According D'Arce (2002) after performed the molecular characterization by RFLP of several strains of BoHV-1 and 5, the some Brazilian isolatedes of BoHV-5 were "5a" as the Australian N569, differently from the Argentinean A663 "5b". In the present paper however, according the nucleotide phylogenetic analysis, the BoHV-5 isoalted were grouped apparently with basis on the geographical origins.

After analyzed the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of BoHV-1.1; 1.2 and 5 D'Arce (2002) suggest that ISO 45 and 87 isolatedes could form a third group of BoHV-5 subtype, "c", or non "a" non "b" group. Later these results were corroborated by Souza (2002), using a panel of monoclonal antibodies (Souza et al., 2002). In this study these two isolatedes were located in a different cluster than others isolatedes of BoHV-5 from SA. A Brazilian isolated of BoHV-5 (SV507) showed some differences from others BoHV-5 strains on the phylogenetic trees (figures. 2 and 5).

The amino acid analysis grouped the strains basically in two groups, one of BoHV-1 and another with BoHV – 5 strains (figure 5). These analysis enhanced the difference noted at nucleotide analysis in the N569 and Uy2002 strains, in the other hand, the difference seen in the nucleotide analysis with the other strains was diminished.

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is spread world wide and is responsible for several economic losses to beef and dairy cattle. As BoHV-5 is very closely related to BoHV-1 sharing a high degree of genomic and antigenic homology, differential methods for diagnosis are very important tools in order to achieve a better understanding of the epidemiology of BoHV-1 and 5. In summary, the present report a carboxi-terminal region of the BoHV-1 and 5 gC gene was amplified, sequenced and analyzed. According the results pointed here this region showed to be a good choice in order to analyze the relatedness of the BoHV-1 and BoHV-5 allowing the molecular differentiation and classification of such viruses in BoHV-1.1; BoHV-1.2 or BoHV-5 helping with a better understanding of the epidemiology of such viruses.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq and CAPES. Roehle, PM is a CNPq research fellow.

## References

- Alegre, M.; Nanni, M.; Fondevila, N. (2001). "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 **48**(8): 613-21.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997). "'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs'." Nucleic Acids Res **25**: 3389-3402
- Chowdhury, S. I. (1997). "Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides." Vet Microbiol **58**(2-4): 309-14.
- Claus, M. P.; Alfieri, A. F.; Folgueras-Flatschart, A. V.; Wosiacki, S. R.; Medici, K. C.; Alfieri, A. A. (2005). "Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR." J Virol Methods **128**(1-2): 183-8.
- D'Arce, R. C.; Almeida, R. S.; Silva, T. C.; Franco, A. C.; Spilki, F.; Roehe, P. M.; Arns, C. W. (2002). "Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5." Vet Microbiol **88**(4): 315-24.
- Delhon, G.; Moraes, M. P.; Lu, Z.; Afonso, C. L.; Flores, E. F.; Weiblen, R.; Kutish, G. F.; Rock, D. L. (2003). "Genome of bovine herpesvirus 5." J Virol **77**(19): 10339-47.
- Edwards, S.; Newman, R. H.; White, H. (1991). "The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype." Br Vet J **147**(3): 216-31.
- Efron, B.; Halloran, E.; Holmes, S. (1996 ). "Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees." PNAS **93**: 13429-13434.
- Engels, M.; Palatini, M.; Metzler, A. E.; Probst, U.; Kihm, U.; Ackermann, M. (1992). "Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and the foreign hosts." Vet Microbiol **33**(1-4): 69-78.
- Esteves, P. A.; Spilki, F. R.; Franco, A. C.; Silva, T. C.; Oliveira, E. A.; Moojen, V.; Esmeraldino, A. M.; Roehe, P. M. (2003). "Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs." Vet Rec **152**(21): 658-9.
- Fitzpatrick, D. R.; Babiuk, L. A.; Zamb, T. J. (1989). "Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses." Virology **173**(1): 46-57.
- Gomes, L. I.; Rocha, M. A.; Souza, J. G.; Costa, E. A.; Barbosa-Stancioli, E. F. (2003). "Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene." Vet Res Commun **27**(6): 495-504.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." **41**: 95-98.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. (2004). "MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment." Brief Bioinform **5**: 150-163.
- Madin S.H., York C.J. & McKercher D.G. (1956). "Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus." Science **124**:721-722.

- Metzler, A. E.; Schudel, A. A.; Engels, M. (1986). "Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease." Arch Virol **87**(3-4): 205-17.
- 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**(4): 633-52.
- Miller, J. M.; Whetstone, C. A.; Van der Maaten, M. J. (1991). "Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA." Am J Vet Res **52**(3): 458-61.
- Pidone, C. L.; Galosi, C. M.; Echeverria, M. G.; Nosetto, E. O.; Etcheverrigaray, M. E. (1999). "Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina." Zent Vet B **46**(7): 453-6.
- Puentes, R.; Alonzo, P.; Silva, A. D.; Esteves, P. A.; Roehe, P. M.; Maisonnave, J. (2005). Isolation and characterization of samples of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) from Uruguay. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos/ SP; Brazil.
- Rijsewijk, F. A.; Kaashoek, M. J.; Langeveld, J. P.; Meloen, R.; Judek, J.; Bienkowska-Szewczyk, K.; Maris-Veldhuis, M. A.; van Oirschot, J. T. (1999). "Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains." J Gen Virol **80** ( Pt 6): 1477-83.
- Roehe, P. M.; Silva, T. C.; Nardi, N. B.; Oliveira, L. G.; Rosa, J. C. A. (1997). "Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais." Pesq Vet Bras **17**(1): 41-44.
- Roizman, B.; Desrosiers, R. C.; Fleckenstein, B.; Lopez, C.; Minson, A. C.; Studdert, M. J. (1992). "The Family Herpesviridae: an up date." Arch Virol **123**: 425-448.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 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. (2002). "Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5)." Pesq Vet Bras **22**: 13-18. .
- Spilki, F. R.; Esteves, P. A.; da Silva, A. D.; Franco, A. C.; Rijsewijk, F. A.; Roehe, P. M. (2005). "A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2)." J Virol Methods **129**(2): 191-3.
- Spilki, F. R.; Esteves, P. A.; Lima, M.; Franco, A. C.; Chiminazzo, C.; Flores, E. F.; Weiblen, R.; Driemeier, D.; Roehe, P. M. (2004). "Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a)." Pesq Vet Bras **24**(1): 43-49.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice " Nucleic Acids Res **22** 4673-4680.
- Weiblen, R.; de Barros, C. S.; Canabarro, T. F.; Flores, I. E. (1989). "Bovine meningoencephalitis from IBR virus." Vet Rec **124**(25): 666-7.



## Tables and figures

**Table 1.** Bovine herpesviruses used in the present study.

Vírus	Classification	Clinical Signs	Country/ State	Reference/ Origin
1 Los Angeles (LA)	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	USA	Madin et al., 1956
2 Cooper	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	USA	Madin et al., 1956
3 Lam	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	HOL	Van Engelenburg et al. 1994
4 T3	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	URU	FVURU <sup>1</sup>
5 UY1999	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	URU	FVURU
6 UY2002	BoHV-1.2	Rhinotracheitis	URU	FVURU
7 UY2004	BoHV-1.2	Rhinotracheitis	URU	FVURU
8 SV265/96	BoHV-1.2	Rhinotracheitis	BRA/RS	UFMS <sup>2</sup>
9 EVI123/98	BoHV-1.1	Rhinotracheitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
10 EVI14/94	BoHV-1.2	Abortion	BRA/RS	Souza et al., 2002
11 EVI1779	BoHV-1.2	Abortion	BRA/RS	IPVDF <sup>2</sup>
12 PG2560	BoHV-1.1	Abortion	BRA/RS	IPVDF
13 A663	BoHV-5	Encephalitis	ARG	Carrillo et al., 1983
14 N569	BoHV-5	Encephalitis	AUS	French, 1962
15 T2	BoHV-5	Encephalitis	URU	FVURU
16 AA05	BoHV-5	Encephalitis	BRA/MS	Souza et al., 2002
17 EVI88/95	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
18 EVI99	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
19 EVI100	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
20 EVI340/96	BoHV-5	Encephalitis	BRA/MS	Souza et al., 2002
21 SV136	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
22 SV507	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Delhon et al., 2003
23 Taim	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
24 ISO45/97	BoHV-5	Encephalitis	BRA/MG	Souza et al., 2002
25 ISO87/97	BoHV-5	Encephalitis	BRA/SP	Souza et al., 2002
26 P160/96	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RJ	Souza et al., 2002
27 RP	BoHV-5	Encephalitis	BRA/RS	Souza et al., 2002
28 V175	BoHV-5	Semen	BRA/RS	Esmeraldino et al., 1996

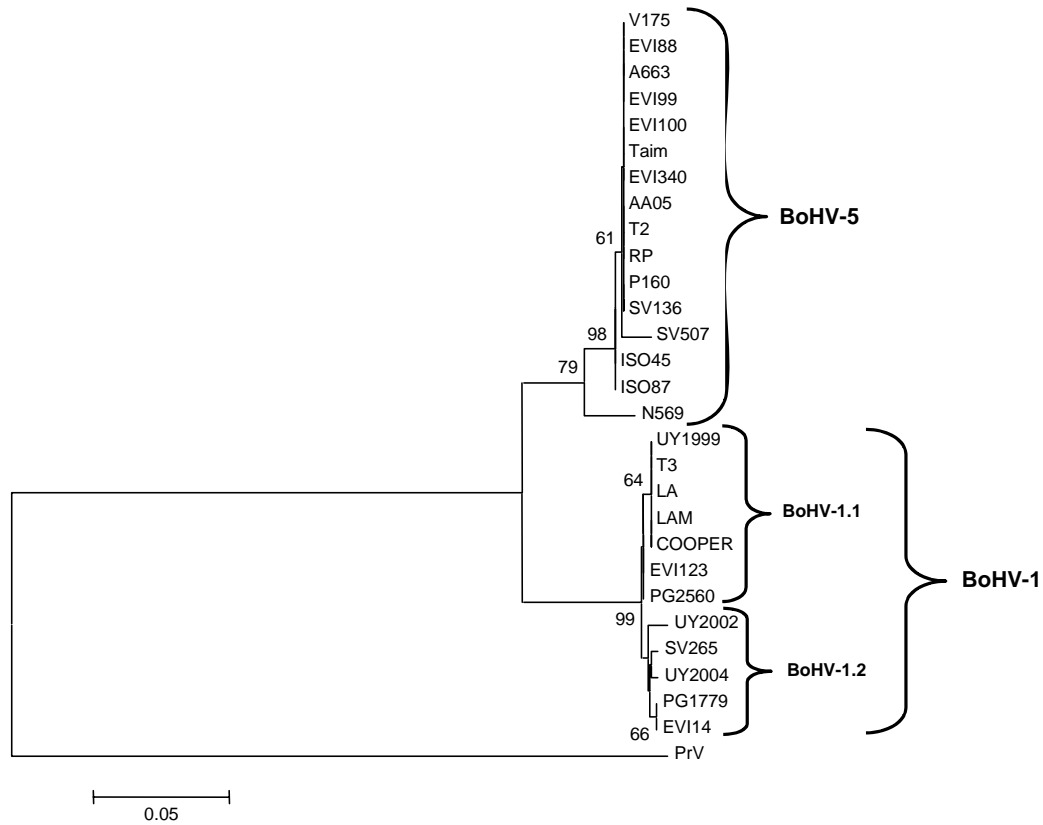
1. Universidad de la República/ Uruguay

2. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor/ Rio Grande do Sul/ Brazil





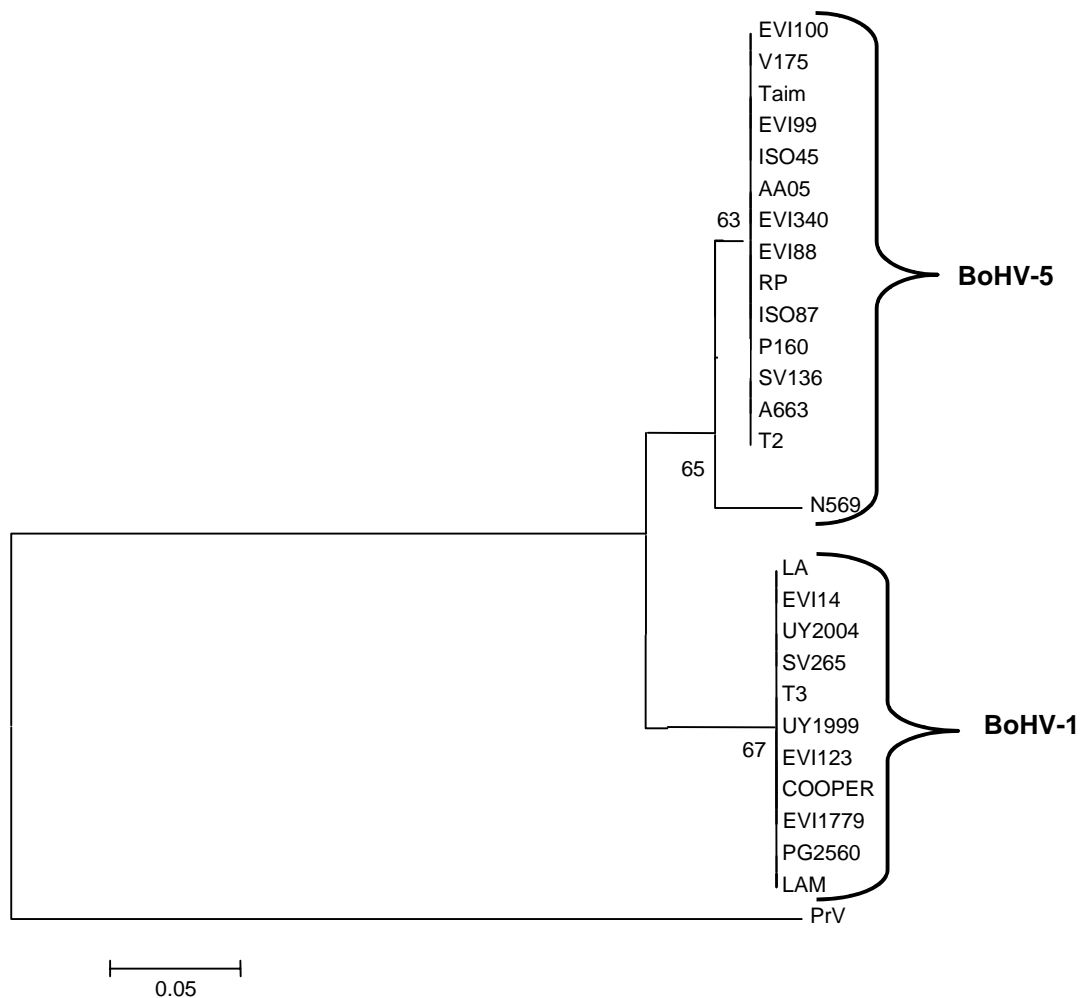
**Figure 2.** Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the gC gene of 28 BoHV-1 and BoHV-5 strains/isolates (positions 961-1351/ gCBoHV-1 and 901-1288/ gCBoHV-5) For the parameters used to measure genetic relationships please refer to the text. Only bootstrap values higher than 50% of 2000 replicates are shown.



**Figure 3.** Alignment of the region comprising the carboxy-terminal region of gC protein (amino acid residues 321 to 450 on BoHV-1 and 301 to 429 on BoHV-5).

Position (BoHV-5)		305	306	318	321	323	328	332	340	341	346	349	362		389	397	409	417	418
BoHV-5	Z49224	G	T	A	A	A	S	E	D	V	A	A	F	o	A	S	M	A	I
	N569	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	o	.	.	.	.	.
	SV507	D	F	E	T	T	N	.	.	.	.	.	.	o	.	.	.	.	.
	A663 <sup>A</sup>	D	S	E	T	T	N	.	.	.	.	.	.	o	.	.	.	.	.
BoHV-1	Z49223	D	S	E	T	T	N	D	N	M	Y	G	Y	G	I	T	L	T	T
	COOPER <sup>B</sup>	D	S	E	T	T	N	D	N	M	Y	G	Y	G	I	T	L	T	T
	UY2002	D	S	E	T	T	N	.	N	M	Y	G	Y	G	I	T	L	T	T
Position (BoHV-1)		325	326	338	341	343	348	352	360	361	366	369	382	398	410	418	430	438	439

**Figure 4.** Phylogenetic relationships were estimated with the carboxy-terminal region of gC protein nucleotide 28 sequences (amino acid residues 321 to 450 on BoHV-1 and 301 to 429 on BoHV-5) of Brazilian and worldwide distributed strains of BoHV-1.1; 1.2 and 5. For the parameters used to measure genetic relationships please refer to the text. Only the bootstrap values higher than 50% of 2000 replicates are shown.



**Figure 5.** Homology percentages of pairwise distances between glycoprotein C nucleotide and deduced amino acid sequences of selected strains of BoHV-1 and BoHV-5. Nucleotide and amino acid values are given in normal and italic letters, respectively. Sequences from the glycoprotein C gene of BoHV-1 and BoHV-5 (accession numbers Z49223 and Z49224 respectively) were included for comparison. The strains with the same identity scores were grouped as: A) AA05/ EVI88; A663/ EVI100/ EVI99/ EVI340/ P160 / RP/ SV136/ T2/ Taim/ V175; B) ISO45; ISO87; C) Cooper/ LA/ LAM/ T3/ UY1999; D) EVI123/ PG2560; E) EVI14/ EVI1779; F) SV265/ UY2004.

Viruses		BoHV-5					BoHV-1					
		Z49224	NC569	SV507	A663 <sup>A</sup>	ISO45 <sup>B</sup>	Z49223	COOPER <sup>C</sup>	EVI123 <sup>D</sup>	EVI14 <sup>E</sup>	SV265 <sup>F</sup>	UY2002
BoHV-5	Z49224	<b>ID</b>	<i>100,0</i>	<i>92,1</i>	<i>93,7</i>	<i>94,2</i>	<i>47,9</i>	<i>79,2</i>	<i>78,7</i>	<i>78,6</i>	<i>78,1</i>	<i>77,5</i>
	NC569	100,0	<b>ID</b>	<i>92,1</i>	<i>93,7</i>	<i>94,2</i>	<i>78,6</i>	<i>79,2</i>	<i>78,7</i>	<i>78,6</i>	<i>78,1</i>	<i>77,5</i>
	SV507	96,0	96,0	<b>ID</b>	<i>97,9</i>	<i>97,4</i>	<i>81,0</i>	<i>81,6</i>	<i>81,0</i>	<i>80,4</i>	<i>80,4</i>	<i>79,9</i>
	A663 <sup>A</sup>	96,8	96,8	99,0	<b>ID</b>	<i>99,5</i>	<i>83,3</i>	<i>83,9</i>	<i>83,3</i>	<i>82,7</i>	<i>82,7</i>	<i>82,2</i>
	ISO45 <sup>B</sup>	97,1	97,1	98,7	99,7	<b>ID</b>	<i>83,8</i>	<i>84,4</i>	<i>83,9</i>	<i>83,3</i>	<i>83,3</i>	<i>82,7</i>
BoHV-1	Z49223	70,0	88,9	90,3	91,5	91,7	<b>ID</b>	<i>98,5</i>	<i>98,0</i>	<i>98,5</i>	<i>99,5</i>	<i>97,5</i>
	COOPER <sup>C</sup>	89,2	89,2	90,6	91,8	92,0	99,2	<b>ID</b>	<i>99,5</i>	<i>99,0</i>	<i>99,0</i>	<i>98,0</i>
	EVI123 <sup>D</sup>	88,9	88,9	90,4	91,5	91,8	99,0	99,8	<b>ID</b>	<i>98,5</i>	<i>98,5</i>	<i>97,5</i>
	EVI14 <sup>E</sup>	88,9	88,9	90,0	91,2	91,4	99,2	99,5	99,2	<b>ID</b>	<i>99,0</i>	<i>98,0</i>
	SV265 <sup>E</sup>	88,6	88,6	90,0	91,2	91,5	99,8	99,5	99,2	99,5	<b>ID</b>	<i>98,0</i>
	UY2002	88,3	88,3	89,8	90,9	91,2	98,7	99,0	98,7	99,0	99,0	<b>ID</b>

### Capítulo 3

#### **Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs**

Esteves, P.A<sup>1</sup>.; Spilki, F.R<sup>1</sup>.; Franco, A.C<sup>1</sup>.; Silva, T.C<sup>1</sup>.; Oliveira, E.A.S<sup>1</sup>.; Moojen, V.; Esmeraldino, A.M<sup>3</sup>.; Roehe, P.M<sup>1,2</sup>.

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV;
2. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) FEPAGRO Animal Health, Caixa Postal 2076, Porto Alegre 90001-970, RS/ Brazil.
3. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS/ Brazil.

The Veterinary Records, v. 152; p. 658-659. 2003.



Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) has a major impact on the cattle industry. The virus is the causative agent of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IBV). It is also recognized as an important cause of abortion and a number of other syndromes, including, albeit rarely, encephalitis (Gibbs and Rweyemamu, 1977; Roels and others, 2000). Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), a close relative of BoHV-1, is the agent of bovine herpesvirus encephalitis (Roizman and others, 1992). In view of the high cross-reactivity of BoHV-5 antibodies with those induced by its close relative BoHV-1, BoHV-5 infections have distributions as yet unknown. Nevertheless, BoHV-5 infections are being identified with an increasing frequency, particularly in Brazil and Argentina (Carrillo and others, 1983; Heinlein and others 1993; Salvador and others, 1998). The disease is characterized by an often fatal meningoencephalitis (Carrillo and others, 1983; Heinlein and others 1993; Salvador and others, 1998; Sanches and others, 2000), although, like other herpesviruses, the number of infections without any clinical signs is probably high. It is an important agent of diseases of the central nervous system, and therefore BoHV-5 (as well BoHV-1) must be considered in the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. BoHV-5 has been isolated from abortions (Heinlein and others, 1993). However, to date, BoHV-5 has not been associated with genital lesions, which are frequently reported for BoHV-1 (Van Oirschot, 1995). Moreover, BoHV-5 isolates have not been identified in male genitalia or semen. This short communication reports the isolation and characterization of BoHV-5 from the semen of a naturally infected Aberdeen Angus bull exhibiting no clinical signs.

During surveillance for viruses at an artificial insemination centre (Esmeraldino, 1996), a virus was isolated from the semen of a bull exhibiting no clinical signs. The isolate induced typical herpesvirus cytopathology on Madin Darby Bovine Kidney cells (ATCC CCL – 24), characterized by rounding and ballooning of cells with formation of syncytia (Esmeraldino, 1996). The isolate named V175, was initially identified as a bovine herpesvirus with the aid of an immunoperoxidase monolayers assay (IPX) with a monoclonal antibody (mAB) that reacts with both BoHV-1 and BoHV-5 (2G5) (Table 1), as described by Roehle and others (1997). The

virus then had its IPX reactivity profile determined against a panel of BoHV-1 and BoHV-5 specific mABs (Souza and others, 2002). The reactivity profile displayed by isolate V175 was identical to that of the BoHV-5 strains included for comparison: N569, A663 and EVI340 (Table 1). In addition, it was distinct from the profile of BoHV-1 strains (Cooper, Oxford and SV265) (Table 1).

To confirm the type of V175 a differential PCR was designed on the basis of the sequence of the BoHV-1 glycoprotein C (gC) gene, a region known by its low degree of homology between BoHV-1 and BoHV-5 (Chowdhury, 1995). The primers designed were 5'-GCCTTCGCTTTCGCC-3' (forward), corresponding to nucleotides 187 to 202 along the BoHV-1 gC sequence, and 5'-CTCGCAGCGCATCCAC-3' (reverse), corresponding to nucleotides 434 to 419 (Chowdhury, 1995). The PCR reaction was carried out in a volume of 15  $\mu$ l containing 2 mM magnesium chloride, 1.5  $\mu$ l Taq buffer 10 X, 1.5  $\mu$ l dimethyl sulphoxide, 0.2 mM of each deoxynucleotide, 1 U Taq polymerase, 15 pmol of each primer and 1  $\mu$ l of the DNA sample.

Amplification was performed in a thermocycler (Techne) with one initial cycle of denaturation (94 °C for three minutes) followed by 35 amplification cycles consisting of denaturation (94 °C for one minute), annealing (60 °C for one minute) and extension (72 °C for one minute). One final extension step was carried out for seven minutes at 72 °C. The reaction revealed an amplicon of the expected size (247 base pairs [bp]) from BoHV-5 strains, whereas a larger amplicon of approximately 330 bp (as determined by gel electrophoresis) was obtained from BoHV-1 strains (Fig 1). As shown in Fig 1, the amplicon from V175 was similar to those of BoHV-5 (N569, A663 and EVI340), but different from those obtained from the BoHV-1 strains (Cooper, Oxford and SV265). In addition, viral DNA was submitted to restriction endonuclease analysis with *Bst* EII as previously described (Engels and others, 1981; D'Arce and others, 2002). The restriction endonuclease profile observed confirmed the similarity of V175 with other BoHV-5 strains (Fig 2).

Viruses with antigenic and genomic BoHV-5 profiles have previously been isolated from two cases of abortion (Heinlein and others, 1993) and from outbreaks of respiratory disease in the absence of neurological signs (P.M. Roehle, unpublished

observations). However, to the author's knowledge this is the first report of the isolation and characterization of BoHV-5 from semen. Like its close relative BoHV-1, BoHV-5 appears to be capable of disseminating in herds via the genital route.

Therefore, sexual contact and semen from BoHV-5 infected bulls might become a potential source of infection for cows, and appropriate care must therefore be taken to avoid transmission. Proper testing of bulls to ensure their negativity for BoHV-5 specific antibodies must be encouraged. It must be borne in mind that, as no BoHV-5 specific antibody assays are yet available, serological testing for bovine herpesvirus is usually performed by serum neutralization test. BoHV-1 neutralizing antibodies are highly cross reactive with BoHV-5 and a proportion of BoHV-5 seropositive animals may not be diagnosed when the serum neutralization test is performed only against BoHV-1 (Teixeira and others, 1998). Therefore, a negative serological test to BoHV-1 does not exclude the possibility of previous contact with BoHV-5. In such cases, effective monitoring for BoHV-5 antibodies should include serum neutralization test against BoHV-5. If BoHV-5 specific serology is unavailable, proper screening of bulls must include virus isolation from genitalia and/or semen otherwise, despite controlling BoHV-1 shedding, BoHV-5 might be disseminated.

#### **Acknowledgements**

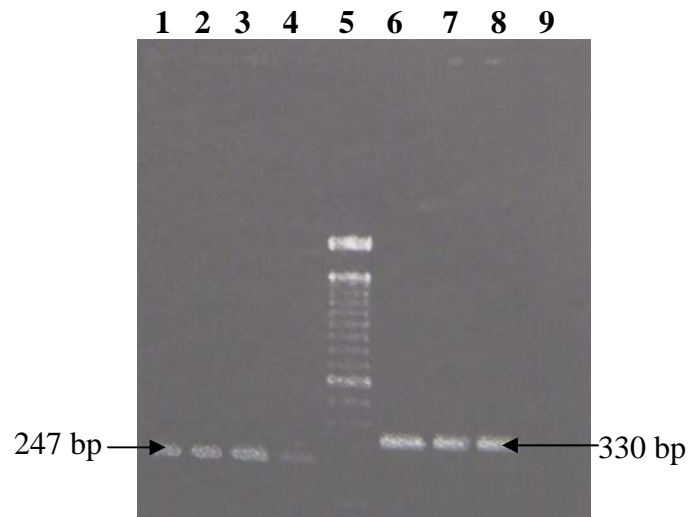
This work was supported by CNPq and CAPES. Roehle, PM is a CNPq research fellow.

**Table 1:** Antigenic profile of reactivity of the V175 semen isolate with monoclonal antibodies (mABs) by an immunoperoxidase monolayer assay. Representative strains/ isolates of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and type 5 (BoHV-5) are included for comparison.

<b>Virus</b>		<b>Mabs</b>				
<b>Type</b>	<b>Strains/ Isolates</b>	<b>BD10</b>	<b>2G5</b>	<b>5A5</b>	<b>7F12</b>	<b>11H6</b>
<b>BHV-5</b>	<b>V175</b>	+	+	-	-	-
	<b>EVI340</b>	+	+	-	-	-
	<b>A663</b>	+	+	-	-	-
	<b>N569</b>	+	+	-	-	-
<b>BHV-1</b>	<b>Cooper</b>	-	+	+	+	+
	<b>Oxford</b>	-	+	+	+	+
	<b>SV265</b>	-	+	+	+	+

+ Positive reaction, - Negative reaction

Origins of the BHV-5 strains, A663, N569, EVI340 and the BHV-1 strains, Cooper, Oxford and SV265 are in Souza and others (2002).

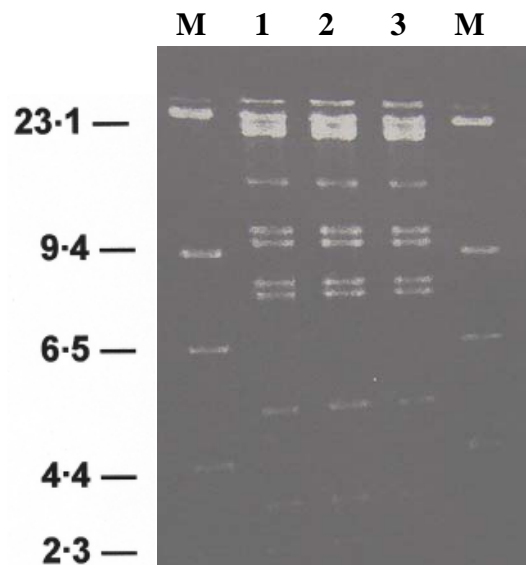


**FIG 1:** Differential PCR for bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) and type 1 (BHV-1).

**Lanes 1 to 4** BHV-5 strains N569, A663 and the semen isolate V175, respectively. **Lane 5** 100 bp DNA ladder.

**Lanes 6 to 8** BHV-1 strains SV265, Cooper and Oxford .,

**Lane 9** Negative control.



**FIG 2:** Restriction enzyme (*Bst EII*) analysis of isolate V175 (**lane 1**), bovine herpesvirus type 5, EV1 340 (**lane 2**) and reference strain N569 (**lane 3**). **Lane M** Lambda/*Hind* III DNA ladder. Sizes of DNA markers are expressed in kilobases (kb).

## References

- CARRILLO, B. J., AMBROGI, A., SCHUDEL, A. A., VAZQUES, M., DAHME, E. & POSPISCHIL, A. (1983) Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* **30**, 327-332
- CHOWDHURY, S. I. (1995) Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology* **213**, 558-568
- D'ARCE, R. C. F., ALMEIDA, R. S., SILVA, T. C., FRANCO, A. C., SPILKI, F. R., ROEHE, P. M. & ARNS, C. W. (2002) Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology* **88**, 315-324
- ENGELS, M., STECK, F. & WYLER, R. (1981) Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology* **67**, 169-174
- ESMERALDINO, A. M. T. (1996) Detecção de Vírus no Sêmen Bovino. MSc thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- GIBBS, E. P. J. & RWEYEMAMU, M. M. (1977) Bovine herpesviruses part 1. *Veterinary Bulletin* **47**, 317-343
- HEINLEIN, A., METZLER, A. E., WEIBLEN, R., BARRIOS, P., SCHUDEL, A. A. & RODRIGUEZ, M. (1993) Molecular characterisation of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *Journal of Veterinary Medicine B* **40**, 125-130
- ROEHE, P. M., SILVA, T. C., NARDI, N. B., OLIVEIRA, L. G. & ROSA, J. C. A. (1997) Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **17**, 41-44
- ROELS, S., CHARLIER, G., LETELLIER, C., MEYER, G., SCHYNTS, F., KERKHOF, P., THIRY, E. & VANOPDENBOSCH, L. (2000) Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Veterinary Records* **146**, 586-588

- ROIZMAN, B., DESROSIERS, R. C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A. C. & STUDDERT, M. J. (1992) The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology* **123**, 425-449
- SALVADOR, S. C., LEMOS, R. A. A., RIET-CORREA, F., ROEHE, P. M. & OSÓRIO, A. L. R. (1998) Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **18**, 76-83
- SANCHES, A.W. D., LANGOHR, I. M., STIGGER, A. L. & BARROS, C. S. L. (2000) Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20**, 113-118
- 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. (2002) Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **22**, 13-18
- TEIXEIRA, M. B., ESTEVES, P. A., COELHO, C. S. S., SILVA, T. C., OLIVEIRA, L. G. & ROEHE, P. M. (1998) Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* **4**, 61-65
- VAN OIRSCHOT, J. T. (1995) Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Veterinary Quarterly* **17**, 29-33

## **5. Discussão Geral**

### **Análise filogenética da região carboxi-terminal da gC de BoHV-1.1/ 1.2 e 5**

A primeira etapa do presente estudo foi desenvolvida visando aprofundar os conhecimentos sobre as diferentes amostras de BoHV-1 (1.1 e 1.2) e 5 isolados na América do Sul mas principalmente do Brasil, baseado na análise da região carboxi-terminal do gene que codifica a gC. A região em estudo apresentou-se bastante conservada em todas as amostras analisadas, foi possível determinar, contudo algumas diferenças principalmente à nível da análise filogenética de nucleotídeos.

As análises filogenéticas de tais seqüências permitiram agrupar os isolados preferencialmente de acordo com sua distribuição geográfica (nucleotídeos). Já a análise de aminoácidos apresentou como resultado uma distribuição das amostras estudadas de acordo com os diferentes tipos de vírus, conforme haviam sido previamente classificados em trabalhos anteriores. Obviamente, através da filogenia realizada com a seqüência de nucleotídeos foi possível perceber maiores diferenças entre os isolados do que as percebidas através da filogenia com a seqüência de aminoácidos.

Interessante ressaltar que neste tipo de análise a amostra de BoHV-5 australiana (N569) apresentou menor homologia com os isolados de BoHV-5 da América do Sul, contrariando resultados obtidos anteriormente através da análise por RFLP (D'ARCE et al., 2003). Por outro lado, as amostras de BoHV-5 ISO 45 e ISO 87 foram agrupadas à parte das outras amostras de BoHV-5 analisadas. Este resultado vai de encontro aos achados por D'Arce et al., 2002 e Souza et al., 2002 onde foi sugerido que tais amostras não pertenceriam aos subtipos previamente descritos (“a” e “b”) de BoHV-5 devido aos resultados apresentados através de análises moleculares – RFLP (D'ARCE et al., 2002) ou antigênicas som anticorpos moleculares (SOUZA et al., 2002).

Tais resultados representam uma importante a um melhor entendimento da epidemiologia de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 no Brasil e América do Sul. Não podemos, contudo, perder de vista que os resultados ora encontrados são dependentes do tipo de análise; da região analisada; bem como do número de isolados utilizados no estudo.



### **Desenvolvimento de uma PCR/REA diferencial entre BoHV-1 e 5**

Devido ao fato de BoHV 1 e 5 compartilharem alta homologia genômica e antigênica, tornam-se necessários estudos visando o melhor entendimento da epidemiologia destes vírus em nosso país. O desenvolvimento de técnicas de detecção e diferenciação de BoHV-1 ou 5 visam contribuir para um melhor entendimento da real distribuição de BoHV-1 e 5.

Utilizando como alvo para a amplificação a região carboxi-terminal da gC de BoHV-1 e 5 descrita acima. Desta forma, com os dados obtidos previamente, foi possível desenvolver uma técnica de detecção e diferenciação (PCR/ REA) entre amostras de BoHV-1 e 5.

A técnica de PCR desenvolvida amplificou um fragmento de 574 / 571 pares de base BoHV-1 (16763 – 17337) e 5 (17671 – 18242) respectivamente. Após a amplificação e purificação os amplicons foram digeridos com a enzima *Bgl* I para evidenciar a diferenciação entre BoHV-1 e 5. A PCR apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutividade adequadas para uma prova laboratorial de diagnóstico.

A prova foi padronizada com 28 diferentes amostras de herpesvírus bovino (tipo 1 ou 5) pertencentes ao estoque de vírus do Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (LABVIR/IPVDF). Estudos estão em andamento visando a avaliação da PCR/REA em amostras de tecido animal podendo, ou não, estarem infectados por BoHV-1 ou/e 5.

### **Descrição de uma amostra de BoHV-5 isolada em sêmen**

O terceiro capítulo do presente trabalho apresenta a caracterização antigênica e molecular de uma amostra de BoHV-5 isolada a partir de sêmen. Anteriormente, BoHV-5 já havia sido isolado a partir de dois casos de aborto (HEINLEIN et al., 1993) bem como de surtos com doença respiratória sem comprometimento nervoso (Roehle, P.M., comunicação pessoal). Este foi, contudo, o primeiro relato de isolamento de uma amostra de BoHV-5 a partir de sêmen.

Desta forma, assim como o BoHV-1, talvez BoHV-5 seja capaz de disseminar-se através da via genital. Assim, é importante uma avaliação do sêmen

também para a presença de BoHV-5 e não somente para BoHV-1. Cabe lembrar que ainda não existem técnicas sorológicas diferenciais para BoHV-1 e 5 sendo possível, no entanto, utilizar técnicas de detecção molecular para alcançar tal diferenciação.

Embora haja uma grande reatividade cruzada entre BoHV-1 e 5 em provas sorológicas (especialmente que detectem anticorpos neutralizantes) há um percentual de animais soropositivos para BoHV-5 que não são detectados como positivos em provas de soroneutraização frente ao BoHV-1 (TEIXEIRA et al., 1998).

Os três capítulos do presente trabalho abordam a questão da epidemiologia de BoHV-1 e 5. Devido ao alto grau de homologia entre si, estes vírus apresentam alta reatividade cruzada em provas de diagnóstico convencionais que baseiem-se na detecção de anticorpos totais. Desta forma, não apenas a epidemiologia de BoHV-5 nos é desconhecida, mas também a real distribuição de BoHV-1 é afetada.

O trabalho realizado visa contribuir para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico diferenciais entre BoHV-1 e 5 para que haja um melhor entendimento da epidemiologia destes vírus especialmente no território Brasileiro.

## Referências Bibliográficas

- ACHOUR, H. A. and MOUSSA, A. (1996). "Serological and virological studies on the infectious bovine rhinotracheitis in Algeria." **Zentralbl Veterinarmed B** 43(4): 251-6.
- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. (2001). "Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5." **Journal of Veterinary Medicine B and Infectious Disease on Veterinary Public Health** 48(8): 613-21.
- ANDRADE, M. A.; FERNANDEZ, C. L.; LORA, O. C. A. (1967). "Investigación de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa de los bovinos en el ganado nativo del Peru." **Revista del Centro Nacional de Patología Animal** 7(11): 51-56.
- ANUNCIACÃO, A. V. M.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C. (1989). "Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de hemaglutinação passiva." **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 41(5): 433-441.
- ASHBAUGH, S. E.; THOMPSON, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J. K. (1997). "Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 9(4): 387-94.
- BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. K. (1996). "Immunology of bovine herpesvirus 1 infection." **Veterinary Microbiology** 53(1-2): 31-42.
- BAGUST, T. J. (1972). "Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus." **Journal of Comparative Pathology** 82(4): 365-74.
- BARROS FILHO, I. R.; KRÜGER, E. R.; SOUZA, J. F.; RICKLI JÚNIOR, W. (1997). Incidência de bovinos soro positivos para o vírus da rinotraqueíte bovina no município de Palotina-PR. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Gramado/ RS/ Brasil.
- BELKNAP, E. B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; SCHULTHEISS, P. C. (1994). "Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3." **Veterinary Pathology** 31(3): 358-65.
- BITSCH, V. (1978). "The P 37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test." **Acta Veterinaria Scandinavica** 19(4): 497-505.
- BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. P.; RASKIN, A.; DUFÉY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOF, P. (2000). "Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population." **Preventive Veterinary Medicine** 45(3-4): 285-95.
- BOLTON, D. C.; ZEE, Y. C.; ARDANS, A. A. (1983). "Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis." **Veterinary Microbiology** 8(1): 57-68.

- BRAKE, F. and STUDDERT, M. J. (1985). "Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus." **Australian Veterinary Journal** 62(10): 331-4.
- BULACH, D. M. and STUDDERT, M. J. (1990). "Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus." **Archives of Virology** 113(1-2): 17-34.
- CARRILLO, B. J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A. A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. (1983). "Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina." **Zentralbl Veterinarmed B** 30(5): 327-32.
- CASCIO, K. E.; BELKNAP, 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." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 11(2): 134-9.
- CASTRUCCI, G.; MARTIN, W. B.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; SALVATORI, D.; TAGLIATI, S.; CUTERI, V. (1997). "A serological survey of bovine herpesvirus-1 infection in selected dairy herds in northern and central Italy." **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 20(4): 315-7.
- CHO, H. J. and BOHAC, J. G. (1985). "Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle." **Canadian Journal of Comparative Medicine** 49(2): 189-94.
- CHOWDHURY, S. I. (1995). "Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5." **Virology** 213(2): 558-68.
- CHOWDHURY, S. I. (1997). "Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides." **Veterinary Microbiology** 58(2-4): 309-14.
- CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.; WOSIACKI, S. R.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. A. (2005). "Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR." **Journal of Virological Methods** 128(1-2): 183-8.
- COFFIN, R. S.; HOWARD, M. K.; LATCHMAN, D. S. (1995). "Altered dinucleotide content within the latently transcribed regions of the DNA of alpha herpes viruses--implications for latent RNA expression and DNA structure." **Virology** 209(2): 358-65.
- D'ARCE, R. C.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; SPILKI, F.; ROEHE, P. M.; ARNS, C. W. (2002). "Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5." **Veterinary Microbiology** 88(4): 315-24.
- 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." **American Journal of Veterinary Research** 54(4): 534-9.

- DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z.; AFONSO, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. (2003). "Genome of bovine herpesvirus 5." **Journal of Virology** 77(19): 10339-47.
- DEREGT, D.; CHO, H. J.; KOZUB, G. C. (1993). "A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies." **Canadian Journal of Veterinary Research** 57(1): 56-9.
- DUCA, P.; BESSA, L. R. G.; RESENDE, M. (2000). "The development and standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against bovine herpesvirus 5 (BHV-5) in sheep sera." **Virus Reviews and Research** 3: 118- HS26.
- EDWARDS, S. and GITAO, G. C. (1987). "Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination." **Veterinary Microbiology** 13(2): 135-41.
- EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. (1990). "A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K." **Veterinary Microbiology** 22(2-3): 213-23.
- EDWARDS, S.; NEWMAN, R. H.; WHITE, H. (1991). "The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype." **British Veterinary Journal** 147(3): 216-31.
- EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. (1996 ). "Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees." **PNAS** 93: 13429-13434.
- ELY, R. W.; D'OFFAY, J. M.; RUEFER, A. H.; CASH, C. Y. (1996). "Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 8(4): 487-92.
- ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. (1981). "Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis." **Archives of Virology** 67(2): 169-74.
- ENGELS, M.; LOEPFE, E.; WILD, P.; SCHRANER, E.; WYLER, R. (1987). "The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1." **Journal of General Virology** 68 ( Pt 7): 2019-23.
- ENGELS, M.; GIULIANI, C.; WILD, P.; BECK, T. M.; LOEPFE, E.; WYLER, R. (1986). "The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization." **Virus Research** 6(1): 57-73.
- ENGELS, M.; PALATINI, M.; METZLER, A. E.; PROBST, U.; KIHM, U.; ACKERMANN, M. (1992). "Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and the foreign hosts." **Veterinary Microbiology** 33(1-4): 69-78.
- ESTEVEES, P. A.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, E. A.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A. M.; ROEHE, P. M. (2003). "Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs." **Veterinary Records** 152(21): 658-9.
- FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. (1993). San Diego, Academic Press.

- FITZPATRICK, D. R. and BIELEFELDT-OHMANN, H. (1991). "Mechanisms of herpesvirus immuno-evasion." **Microbial Pathogenesis** 10(4): 253-259.
- FITZPATRICK, D. R.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. (1989). "Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses." **Virology** 173(1): 46-57.
- FONDEVILA, N. A.; LAGER, A.; SADIR, A. M.; CARRILO, B. J.; VILLAR, J.; ZURBRIGEN, M.; GONZALEZ, D.; IVANCOVICH, J.; SCHUDEL, A. A. (1981). " Rinotraqueitis infecciosa bovina (HVB-1). III- Prevalência de anticuerpos en rodeos bovinos del país." **Revista de Investigacion Agropecuaria- INTA** 16: 285-289.
- FORT, M. C.; IBARGUREN, C.; BUSETTI, M. R.; ESAIN, F.; PEREZ, L. R. (1996). Prevalência de anticorpos contra el herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en la pablación bovina de los departamentos de la provincia de La Pampa - Argentina. Panamerican Association of Veterinary Sciences, Campo Grande.
- FRIEDLI, K. and METZLER, A. E. (1987). "Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains." **Archives of Virology** 94(1-2): 109-22.
- FUCHS, M.; HUBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA, H. J. (1999). "Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E." **Journal of Clinical Microbiology** 37(8): 2498-507.
- GALARZA, J. M. and PERIOLO, O. H. (1983). "Rinotraqueítis infecciosa bovina - prevalência en la provincia de Formosa mediante la prueba de inmunofluorescência indirecta." **Gaceta Veterinaria** 45: 1296-1300.
- GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. (1963). " Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil." **Boletim do Instituto de Biologia da Bahia** 6: 15-25.
- GIBBS, E. P. J. and RWEYEMAMU, M. M. (1977). "Bovine herpesvirus. Part I. bovine herpesvirus 1." **The Veterinarian Bulletin** 47: 317-343.
- GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; SOUZA, J. G.; COSTA, E. A.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. (2003). "Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene." **Veterinary Research Communication** 27(6): 495-504.
- GRAHAM, D. A.; MAWHINNEY, K. A.; MCSHANE, J.; CONNOR, T. J.; ADAIR, B. M.; MERZA, M. (1997). "Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 9(1): 24-31.
- GRÉGIO, C. R. V.; ANDRADE, C. M.; TRÉS, J. E.; SANTOS, J. C. B.; SOUZA FILHO, R. S. (2000). "Profile of neutralizing serum antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle in Rio de Janeiro state." **Virus Reviews & Research** 3: 77-A07.
- GRIFFITHS, I. B.; GALLEGOM, M. I.; MARINO, O.; DE CLAVIJO, E.; DIAZ, I. (1983). "Antibodies against viral pathogens in dairy cattle in Colombia." **Tropical Animal Health Production** 15(4): 214.

- HANON, E.; KEIL, G.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P.; VANDERPLASSCHEN, A.; RIJSEWIJK, F. A.; BABIUK, L.; PASTORET, P. P. (1999). "Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D." **Virology** 257(1): 191-7.
- HEINLEIN, A. S.; METZLER, A. E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A. A.; RODRIGUEZ, M. (1993). "Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE." **Zentralbl Veterinarmed B** 40(2): 125-30.
- HERRING, A. J.; NETTLETON, P. F.; BURRELLS, C. (1980). "A micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus." **Veterinary Records** 107(7): 155-6.
- HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; RIEDEMANN, S.; REINHARDT, G.; NIEDDA, M. (1986). "[Infectious bovine rhinotracheitis. Kinetics of antibody in a dairy herd]." **Zentralbl Veterinarmed B** 33(9): 697-703.
- HOSSAIN, A.; SCHANG, L. M.; JONES, C. (1995). "Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1." **Journal of Virology** 69(9): 5345-52.
- HUEMER, H. P.; WANG, Y.; GARRED, P.; KOISTINEN, V.; OPPERMANN, S. (1993). "Herpes simplex virus glycoprotein C: molecular mimicry of complement regulatory proteins by a viral protein." **Immunology** 79(4): 639-47.
- IMMERGLUCK, L. C.; DOMOWICZ, M. S.; SCHWARTZ, N. B.; HEROLD, B. C. (1998). "Viral and cellular requirements for entry of herpes simplex virus type 1 into primary neuronal cells." **Journal of General Virology** 79: 549-559.
- JONES, C. (2003). "Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency." **Clinical Microbiology Review** 16(1): 79-95.
- KAHRS, R. F. and SMITH, R. S. (1965). "Infectious Bovine Rhinotracheitis, Infectious Pustular Vulvovaginitis, and Abortion in a New York Dairy Herd." **Journal of American Veterinary Medicine Association** 146: 217-20.
- KIRBY, F. D.; MARTIN, H. T.; OSTLER, D. C. (1974). "An indirect haemagglutination test for the detection and assay of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus." **Veterinary Records** 94(16): 361-2.
- KRAHL, M.; BRAGA, A. C.; OLIVEIRA, L. G.; NETO, J. A. S. P.; PRADO, J. A. P.; ROSA, J. C. A.; WUNDER JÚNIOR, E. (1997). Pesquisa de anticorpos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Gramado/RS/ Brasil.
- KRAMPS, J. A.; BANKS, M.; BEER, M.; KERKHOF, P.; PERRIN, M.; WELLENBERG, G. J.; OIRSCHOT, J. T. (2004). "Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe." **Veterinary Microbiology** 102(3-4): 169-81.
- 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. (1994). "A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1." **Journal of Clinical Microbiology** 32(9): 2175-81.

- KUNG, D. C.; LANGONI, H.; SAVOLDI, F.; CABRAL, K. G. (1996). Serological survey of infectious bovine rinotracheitis - IBR antibodies detection. PANVET, XV, Campo Grande/MT/ Brasil.
- LANGONI, H.; PAES, A. C.; TONIN, F. B.; SILVA, A. V.; DENARDI, M. B. (1995). Prevalence of BVD, IBR and PI3 in bovine by ELISA test. Encontro Nacional de Virologia, Ribeirão Preto/ SP/ Brasil.
- LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. (2000). "Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1." **Archives of Virology** 145(10): 2047-59.
- LINDNER, A.; LIEBERMANN, H.; AMBROSIUS, H. (1993). "[Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in sheep sera]." **Dtsch Tierarztl Wochenschr** 100(10): 390-5.
- LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. (1995). "Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul." **Ciência Rural** 25: 425-430.
- LUDWIG, H. (1972). "[Genetic material of herpesviruses. II. Genetic relatedness of various herpesviruses]." **Medicine, Microbiology and Immunology** 157(3): 212-38.
- LYAKU, J. R.; VILCEK, S.; NETTLETON, P. F.; MARSDEN, H. S. (1996). "The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis." **Veterinary Microbiology** 48(1-2): 135-42.
- MAGYAR, G.; TANYI, J.; HORNYAK, A.; BARTHA, A. (1993). "Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis." **Acta Veterinaria Hungarica** 41(1-2): 159-70.
- MAYFIELD, J. E.; GOOD, P. J.; VANOORT, H. J.; CAMPBELL, A. R.; REED, D. E. (1983). "Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain)." **Journal of Virology** 47(1): 259-64.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BEUTTEMULLER, E. A.; OLIVEIRA, R. R.; DUCATTI, S. O. (1996). Evidência sorológica da infecção de bovinos de corte pelo herpesvírus bovino tipo 1, na região de Londrina, PR. PANVET, XV, Campo Grande/MT/ Brasil.
- MÉDICI, K. C.; MASCARDI, J. E.; OLIVEIRA, D. B.; FERREIRA, M. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. (2000). Bovine herpesvirus 1 serum antibodies in beef and dairy cattle herds in Paraná state. **Virus Reviews & Research**.
- METTENLEITER, T. C. (2002). "Herpesvirus Assembly and Egress." **Journal of Virology** 76(4): 1537-1547.
- METTENLEITER, T. C. (2003). "Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread " **Virus Research** 92: 197-206.
- METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. (1986). "Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease." **Archives of Virology** 87(3-4): 205-17.



- METZLER, A. E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. (1985). "European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies." **Archives of Virology** 85(1-2): 57-69.
- MEYER, G.; HANON, E.; GEORLETTE, D.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. (1998). "Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture." **Journal of General Virology** 79 ( Pt 8): 1983-7.
- 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." **Archives of Virology** 146(4): 633-52.
- MILLER, J. M.; WHETSTONE, C. A.; VAN DER MAATEN, M. J. (1991). "Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA." **American Journal of Veterinary Research** 52(3): 458-61.
- MILLER, J. M.; WHETSTONE, C. A.; BELLO, L. J.; LAWRENCE, W. C.; WHITBECK, J. C. (1995). "Abortion in heifers inoculated with a thymidine kinase-negative recombinant of bovine herpesvirus 1." **American Journal of Veterinary Research** 56(7): 870-4.
- MISRA, V.; BABIUK, L. A.; DARCEL, C. L. (1983). "Analysis of bovine herpes virus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting." **Archives of Virology** 76(4): 341-54.
- MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; MACHADO, J. S.; CAMPOS, M. T. G. R.; RIBEIRO, L. O. C. (1981). "Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo." **Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo)** 47: 55-59.
- OKAZAKI, K.; HONDA, E.; KONO, Y. (1994). "Heparin-binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII." **Archives of Virology** 134(3-4): 413-9.
- OSORIO, F.; SRIKUMARAN, S.; RHODES, M.; CHRISTENSEN, D.; SRIKUMARAN, P. (1989). "Detection of bovine herpesvirus-1-specific IgM using a capture enzyme immune assay with isotype-specific monoclonal antibodies." **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 1(2): 139-45.
- PETZOLD, S. A.; RECKZIEGEL, P. E.; PRADO, J. A. P.; TEIXEIRA, J. C.; WALD, V. B.; ESTEVES, P. A.; SPILKI, F. R.; ROEHE, P. M. (2001). "Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an inactivated vaccine to BHV-1. ." **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science** 38(3): 184-187.
- PIDONE, C. L.; GALOSI, C. M.; ECHEVERRIA, M. G.; NOSETTO, E. O.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. (1999). "Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina." **Zentralbl Veterinarmed B** 46(7): 453-6.

- PITUCO, E. M. (1988). Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/ vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos criados nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. Utilização das reações sorológicas de microssoroneutralização, microhemaglutinação passiva e da imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus bovino 1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP. São Paulo, Universidade de São Paulo. **MsC**: 74.
- PORTERFIELD, J. S. (1989). London.
- PUNTES, R.; ALONZO, P.; SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; MAISONNAVE, J. (2005). Isolation and characterization of samples of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) from Uruguay. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos/ SP; Brazil.
- RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. (1989). "Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do estado do rio grande do sul." **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS** 17: 95-98.
- RIBEIRO, M. B. A., F.J.; BRANCO, M.B.C. (1982). Prevalência de anticorpos para a rinotraqueíte infecciosa dos bovinos na Bahia. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, Camboriú/ SC/ BR.
- RIEDEMANN, S. R., G.; TADISCH, N.; AGUILAR, M.; AGUILAR, R.; MONTECINOS, M.I.; MIRANDA, J.C. (1996). " Seroprevalence of bovine diarrhoea virus (BDV), bovine herpesvirus 1 (BHV-1), parainfluenza virus (PI3) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in 12 dairy herds in the province of Valdivia in Chile." **Archives of Medicine Veterinary** 28: 121-124.
- RIET-CORREA, F. V., T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C (1989). "Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino -1." **Pesquisa Veterinária Brasileira** 9: 13-16.
- RIJSEWIJK, F. A.; KAASHOEK, M. J.; LANGEVELD, J. P.; MELOEN, R.; JUDEK, J.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; MARIS-VELDHUIS, M. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. (1999). "Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains." **Journal of General Virology** 80 ( Pt 6): 1477-83.
- RODRIGUEZ, M.; SUAREZ HEINLEIN, A.; RUIZ, M.; METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A. (1989). "Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies." **American Journal of Veterinary Research** 50(5): 619-21.
- ROEHE, P. M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A. (1997). "Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais." **Pesquisa Veterinária Brasileira** 17(1): 41-44.
- ROEHE, P. M.; ALMEIDA, R. S.; TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; OLIVEIRA, E. A. S.; PETZHOLD, S. A.; SILVA, T. C. (1997). "Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5)." **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)** 59(2): 27-32.

- ROEHE, P. M.; TEIXEIRA, M. B.; ESTEVES, P. A.; MELO, S. V.; ALMEIDA, R. S.; D'ARCE, R. C. F.; SILVA, T. C.; LEMOS, R. A.; OLIVEIRA, L. G. (1998). Situação do BHV-1 E BHV-5 no Brasil. . Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), Santa Maria/ RS/ BR.
- ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, E. (2000). "Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow." **Veterinary Records** 146(20): 586-8.
- ROIZMAN, B. and KNIPE, M. D. (2001). Herpes simplex virus and their replication. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins publishers.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. (1992). "The Family Herpesviridae: an up date." **Archives of Virology** 123: 425-448.
- ROS, C.; RIQUELME, M. E.; FORSLUND, K. O.; BELAK, S. (1999). "Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences." **Journal of Virological Methods** 83(1-2): 55-65.
- RUSVAI, M. and FODOR, L. (1998). "Occurrence of some viruses and bacteria involved in respiratory diseases of ruminants in Hungary." **Acta Veterinaria Hungarica** 46: 405-414.
- SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSÓRIO, A. L. (1998). "Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo." **Pesquisa Veterinária Brasileira** 18: 76-83.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- SCHWYZER, M. and ACKERMANN, M. (1996). "Molecular virology of ruminant herpesviruses." **Veterinary Microbiology** 53(1-2): 17-29.
- SCHYNTS, F.; BARANOWSKI, E.; LEMAIRE, M.; THIRY, E. (1999). "A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains." **Veterinary Microbiology** 66(3): 187-95.
- SHEN, D. T.; BURGER, D.; LI, Z. Q.; GORHAM, J. R. (1991). "Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain." **Veterinary Microbiology** 28(1): 25-37.
- SMITH, G. A.; YOUNG, P. L.; REED, K. C. (1995). "Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots." **Archives of Virology** 140(3): 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.; ROEHE, P. M. (2002). "Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5)." **Pesquisa Veterinária Brasileira** 22: 13-18.

- SPIPKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; DA SILVA, A. D.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A.; ROEHE, P. M. (2005). "A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2)." **Journal of Virological Methods** 129(2): 191-3.
- SPIPKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; LIMA, M.; FRANCO, A. C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P. M. (2004). "Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a)." **Pesquisa Veterinária Brasileira** 24(1): 43-49.
- STUDDERT, M. J. (1990). "Bovine encephalitis herpesvirus." **Veterinary Records** 126(1): 21-2.
- SUAREZ HEINLEIN, A.; METZLER, A. E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A. A.; RODRIGUEZ, M. (1993). "Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE." **Zentralbl Veterinarmed B** 40(2): 125-30.
- TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; COELHO, C. S. S.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, L. G.; ROEHE, P. M. (1998). "Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5)." **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** 4: 61-65.
- TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; SCHMIDT, C. S.; SPIPKI, F. R.; SILVA, T. C.; DOTTA, M. A.; ROEHE, P. M. (2001). "ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)." **Pesquisa Veterinária Brasileira** 21(1): 33-37.
- THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. (2006). "Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1." **Veterinary Research** 37(2): 169-90.
- TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. (1995). "Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control." **Advanced Virus Research** 45: 191-223.
- TONIN, F. B.; LANGONI, H.; PAES, A. E.; DA SILVA, A. V. (1996). Prevalence of IBR and BVD/MD in bovine by ELISA test. PANVET, XV, Campo Grande.
- VAN DER MEULEN, K. M.; FAVOREEL, H. W.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, H. J. (2006). "Immune escape of equine herpesvirus 1 and other herpesviruses of veterinary importance " **Veterinary Immunology and Immunopath** In press.
- VAN ENGELENBURG, F. A.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. (1993). "Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen." **Journal of Clinical Microbiology** 31(12): 3129-35.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. (1996). "Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines." **Veterinary Microbiology** 53(1-2): 43-54.

- 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. (1995). "Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull." **Veterinary Records** 137(10): 235-9.
- VAN WUIJCKHUISE, L.; BOSCH, J.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; ELBERS, A. R. (1998). "Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds." **Veterinary Records** 142(8): 181-4.
- VIDOR, T.; HALFEN, D. C.; LEITE, T. E.; COSWIG, L. T. (1995). "Herpes bovino tipo1 (BHV 1): Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos." **Ciência Rural** 25: 421-424.
- VILCEK, S. (1993). "Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR." **Journal of Virological Methods** 41(2): 245-7.
- WAGTER, L. H.; GLAS, R. D.; BLEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELBURG, F. A.; RIJSEWIJK, F. A.; HOUWERS, D. J. (1996). "A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine semen." **Veterinary Research Communication** 20(4): 401-8.
- WEIBLEN, R.; DE BARROS, C. S.; CANABARRO, T. F.; FLORES, I. E. (1989). "Bovine meningoencephalitis from IBR virus." **Veterinary Records** 124(25): 666-7.
- WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; FLORES, I. E. (1991). "Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in south Brazil." **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research** 24(8): 773-5.
- WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; SCHUCH, L. F.; REBELATTO, M. C. (1992). "Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis." **Journal of Veterinary Diagnostica Investigation** 4(3): 341-3.
- WELLENBERG, G. J.; MARS, M. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. (2001a). "Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA." **Veterinary Microbiology** 78(1): 79-84.
- WELLENBERG, G. J.; VERSTRATEN, E. R.; BELAK, S.; VERSCHUREN, S. B.; RIJSEWIJK, F. A.; PESHEV, R.; VAN OIRSCHOT, J. T. (2001b). "Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk." **Journal of Virology Methods** 97(1-2): 101-12.
- WHETSTONE, C. A. and MILLER, J. M. (1989). "Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1." **Archives of Virology** 107(1-2): 27-34.
- WILD, P.; SCHRANER, E. M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. (1998). "Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5." **Journal of Virology** 72(12): 9561-6.
- WINKLER, M. T.; DOSTER, A.; JONES, C. (1999). "Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle." **Journal of Virology** 73(10): 8657-68.

- WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z. M. (1972). "Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus, PI-3, IBR e diarreia a vírus, enfermidade das mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul." **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor** 1: 52-58.
- ZUÑIGA, A.; OSSA, J.; HINCAPIÉ, O. (1978). "Prevalência de rinotraqueitis infecciosa bovina en reproductores del Urabá antioqueño para 1977." **Veterinária Colecion del Ciencia e Pecuaria** 1: 135-148.

## **ANEXOS**

Trabalhos publicados durante o curso de doutorado

1. **P. A. Esteves**, F. R. Spilki, A. C. Franco, T. C. Silva, E. A. S. Oliveira, V. Moojen, A. M. Esmeraldino, P. M. Roehe. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Veterinary Records* (2003) 152, 658-659
2. F.R. Spilki, A.C. Franco, M. B. Teixeira, **P. A. Esteves**, R. Schaefer, E. Schmidt, R. A. Lemos and P. M. Roehe Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. *Pesq. Vet. Bras.* (2003) 23(1):1-4, jan./mar.
3. F.R. Spilki, **P.A. Esteves**, M. Lima, A.C. Franco, C. Chiminazzo, E.F. Flores, R. Weiblen, D. Driemeier e P.M. Roehe. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1.1 (BHV-1.1) and 1.2a (BHV-1.2a). *Pesq. Vet. Bras.* (2004) 24(1):43-49, jan./mar.
4. A. D. Silva, V. A. Sortica, A.C. Braga, F.R. Spilki, A. C. Franco, **P. A. Esteves**, F. Rijsewijk, J. C. A. Rosa, H.B. C.R. Batista, A. P. Oliveira e P. M. Roehe. Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 2003. *Pesq. Vet. Bras.* (2005) 25(1):21-24, jan./mar.
5. F. R. Spilki, **P. A. Esteves**, A. D. Silva, A.C. Franco, F.A.M. Rijsewijk, P. M. Roehe. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *Journal of Virological Methods* (2005) 129 191-193
6. S.O. Hübner, A.P. Oliveira, A.C. Franco, **P.A. Esteves**, A.D. Silva, F.R. Spilki, F.A.M. Rijsewijk, P.M. Roehe. Experimental infection of calves with a gI, gE,US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* (2005) 28, 187-196
7. A. D. Silva, F. R. Spilki, A. C. Franco, **P. A. Esteves**, S. O. Hübner, D. Driemeier, A. P. Oliveira, F. Rijsewijk, P. M. Roehe. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine* (2006) 24 3313-3320
8. F.R. Spilki, T.C. Silva, **P.A. Esteves**, M.B. Teixeira, H.B.C.R. Batista, C. Chiminazzo, D. Driemeier, A.C. Franco, P.M. Roehe Co-infections with bovine herpesvirus type 5 and bovine viral diarrhoea virus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*(2006) v.58, n.5, p.699-707