

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 4 EM LÍQUIDOS
FOLICULARES E SÊMEN DE BOVINOS**

FERNANDO FINOKETTI
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 4 EM LÍQUIDOS
FOLICULARES E SÊMEN DE BOVINOS**

FERNANDO FINOKETTI
Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos
requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2014

FERNANDO FINOKETTI
BIOMÉDICO
UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

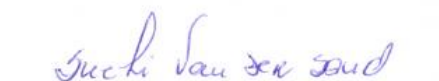
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 04/08/2014
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 04/09/2014
Por:


ANA CLÁUDIA FRANCO
Orientador-UFRGS


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA


ANA PAULA GUEDES FRAZZON
PPGMAA-UFRGS


ANDRÉ FELIPE STRECK
UFRGS


FERNANDO ROSADO SPILKI
FEEVALE


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Finoketti, Fernando
DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 4 EM LÍQUIDOS
FOLICULARES E SÊMEN DE BOVINOS / Fernando Finoketti.
-- 2014.
78 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.
Coorientador: Fabrício Souza Campos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Herpesvírus Bovino Tipo 4. 2. Líquido Folicular.
3. Sêmen. 4. Nested PCR. I. Franco, Ana Cláudia,
orient. II. Souza Campos, Fabrício, coorient. III.
Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades recebidas e pela fé que em muitos momentos de dúvida guiou meu caminho e me deu forças para seguir em frente.

À Profa. Ana Cláudia, pela oportunidade de fazer parte deste grupo qualificado, pela orientação, paciência, confiança e principalmente pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Paulo, pelo incentivo de sempre buscar aperfeiçoar os projetos realizados e os artigos escritos, bem como pelo suporte financeiro e gerenciamento exemplar do grupo.

Ao Dr. Fabrício, por toda ajuda recebida desde a graduação, pelos ensinamentos compartilhados, os puxões de orelha, pela paciência, pela disposição de ajudar e ensinar, pelo exemplo de amor à pesquisa e ao laboratório, e principalmente pela amizade e parceria.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FINEP pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudos.

Aos colegas e amigos do LabVir, pela convivência e colaboração que tornaram o ambiente de trabalho mais alegre, divertido e prazeroso.

À minha namorada Marcela, por todo amor, carinho, companheirismo, apoio e compreensão nessa etapa muito importante da minha vida.

Por fim, meus mais sinceros agradecimentos à minha família, em especial meus pais, Jadir e Ilineta, e meu irmão Felipe, pelo exemplo de dedicação, amor, carinho e caráter. Por entenderem os momentos de ausência e que apesar da distância sempre se fizeram presentes. Muito obrigado, amo vocês!

DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 4 EM LÍQUIDOS FOLICULARES E EM SÊMEN DE BOVINOS ¹

Autor: Fernando Finoketti

Orientadora: Ana Cláudia Franco

Co-orientador: Fabrício Souza Campos

RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) é um herpesvírus membro da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus* que tem sido detectado em bovinos sadios e com diferentes sinais clínicos em todos os continentes. Sugere-se que este vírus está relacionado com diversas doenças do trato reprodutivo de bovinos. Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa desse vírus em amostras biológicas com potencial utilização em biotécnicas de reprodução de bovinos, com o objetivo de reduzir sua transmissão e possíveis prejuízos econômicos advindos de sua infecção. Cento e dezenove amostras de líquido folicular de fêmeas abatidas em frigorífico e 164 amostras de sêmen de centros de inseminação artificial foram submetidas a uma reação de nested PCR para detecção do genoma do BoHV-4. Foi detectado o DNA de BoHV-4 em 2 amostras (1,68%) de líquido folicular e em 14 amostras (8,54%) de sêmen. Sete produtos foram submetidos ao sequenciamento, que revelou a semelhança dessas amostras com amostras europeias. É o primeiro relato de detecção do DNA de BoHV-4 em amostras de líquido folicular de bovinos, o que pode sugerir uma nova via de transmissão desse agente. Dessa forma, as alíquotas de sêmen destinadas à inseminação artificial e os ovários destinados a produção de embriões *in vitro* necessitam de um controle maior para evitar a disseminação do BoHV-4 entre os rebanhos bovinos e possíveis prejuízos econômicos associados ao vírus.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (78 p.) Agosto, 2014.

DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS 4 (BoHV-4) IN FOLLICULAR FLUIDS AND SEMEN FROM BRAZILIAN CATTLE²

Author: Fernando Finoketti

Supervisor: Ana Cláudia Franco

Co-supervisor: Fabrício Souza Campos

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4), a member of the *Gammaherpesvirinae* subfamily, genus *Rhadinovirus* has been detected in healthy as well as diseased cattle in all continents. It is suggested that this virus is associated to several disorders of the reproductive tract of bovines, and the virus or its genome has been found in clinical and biological samples like fetuses, semen and cells of the granulosa. Given the lack of evidences on the circulation of BoHV-4 in bovines of Brazil, specifically from samples from the reproductive tract, this study aimed the detection of BoHV-4 DNA from semen and follicular fluids of bovines. One hundred and nineteen follicular fluid samples obtained from a slaughterhouse and 164 semen samples obtained in artificial insemination centers were subjected to a nested PCR for the detection of BoHV-4 DNA. BoHV-4 DNA was detected in 2 samples (1.68%) from follicular fluid and 14 (8.54%) of semen samples. Seven products were subjected to sequencing, which confirmed the identity of the PCR products and revealed the similarity of these viruses with European virus isolates. It is the first report on the detection of BoHV-4 DNA in bovine follicular fluid samples and semen in Brazil, which may suggest that the virus may be disseminating in Brazilian cattle through reproductive practices. In addition, the results found here point to the a requirement for the testing of such samples, in search for BoHV-4 DNA, in order to prevent the spread of BoHV-4 between the cattle herds and the potential economic losses associated.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (78 p.) August, 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IX
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Objetivo geral.....	2
1.2 – Objetivos específicos.....	2
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – Herpesvírus bovino tipo 4.....	4
2.1.1 – Genoma.....	5
2.1.2 – Ciclo biológico.....	7
2.1.3 – Epidemiologia.....	12
2.1.4 – Associação com patologias.....	14
2.1.5 – Diagnóstico.....	17
2.2 – Importância da presença de vírus em amostras de líquido folicular e sêmen.....	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 – Amostras.....	22
3.1.1 – Coleta de ovários e líquido folicular.....	22
3.1.2 – Coleta de sêmen.....	22
3.2 – Extração de ácidos nucleicos.....	23
3.2.1 – Extração de DNA de líquidos foliculares.....	23
3.2.2 – Extração de DNA de sêmen.....	24
3.3 – Reações em cadeia da polimerase (PCRs).....	25
3.4 – Sequenciamento e análise filogenética.....	30
4 – RESULTADOS.....	31
4.1 – Detecção de BoHV-4 em amostras de líquido folicular e sêmen....	31
4.2 – Análise filogenética.....	33
5 – DISCUSSÃO.....	35
5.1 – Detecção de BoHV-4 em líquidos foliculares.....	35
5.2 – Detecção de BoHV-4 em sêmen	37
5.3 – Nested PCR utilizada para a detecção de BoHV-4	38
5.4 – Análise filogenética das amostras de BoHV-4	39
6 – CONCLUSÕES.....	41
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8 – ANEXOS.....	54
8.1 – Artigo submetido para a revista <i>Archivos de Medicina Veterinaria</i>	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Vírion de herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), modelo da família <i>Herpesviridae</i>	5
Figura 2 Estruturas do DNA de diferentes herpesvírus.....	6
Figura 3 Ciclo replicativo dos herpesvírus: da entrada a exocitose.....	10
Figura 4 Sequências de nucleotídeos amplificadas pela PCR e nPCR de BoHV-4.....	25
Figura 5 Sequência de nucleotídeos do controle interno.....	26
Figura 6 Sensibilidade da reação e BoHV-4.....	27
Figura 7 Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos da PCR.....	30
Figura 8 Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos da nPCR.....	31
Figura 9 Árvore filogenética de BoHV-4.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-4: Herpesvírus bovino tipo 4
BoHV-5: Herpesvírus bovino tipo 5
CI: Controle interno
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucléico
E: genes *early*
ELISA: Ensaio imunoenzimático
EUA: Estados Unidos da América
gp8: Glicoproteína 8
gB: Glicoproteína B
gD: glicoproteína D
gH: Glicoproteína H
gL: Glicoproteína L
gM: Glicoproteína M
HHV-1: Herpesvírus humano tipo 1
IA: Inseminação artificial
IE: genes *immediate early*
IFI: Imunofluorescência indireta
L: genes *late*
LF: Líquido folicular
LUR: Região única longa
MDBK: células de rim de bovino *Madin-Darby*
ML: células pulmonares de vison
MRC-5: Célula diploide de pulmão de feto humano
nPCR: Nested-PCR
OFL: células fetais de pulmão de ovinos
ORF: Fase aberta de leitura
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PGE Prostaglandina E
PIV: Produção *in vitro*
prDNA: DNA polirepetitivo
qPCR: PCR em tempo real
SDS: Dodecil sulfato de sódio
TE: Transferência de embriões
tRNA: RNA transportador
WI-35: Células pulmonares de embrião humano

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o segundo maior rebanho comercial de gado do mundo (IBGE, 2014). Além disso, o país se destaca mundialmente pela alta produção de leite e carne bovina (THIBIER, 2002 e 2006). Esse destaque mundial se deve a aprimoramentos na qualidade do rebanho. Dentre eles o melhoramento genético através da aplicação de biotécnicas de reprodução, como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões (VIEIRA, 2012). Entretanto, estas técnicas são suscetíveis à contaminação do produto final (embrião/feto) com agentes infecciosos que afetam o aparelho reprodutor bovino e podem causar perdas econômicas através de reabsorção embrionária e abortos. Além disso, uma vez que amostras biológicas usadas em biotécnicas da reprodução estejam contaminadas por microorganismos, esses podem ser disseminados ao rebanho através do nascimento de animais infectados. Assim, é de extrema importância a pesquisa de patógenos em amostras de sêmen e líquido folicular, que podem ser utilizadas na reprodução de bovinos, para evitar a possível transmissão e perdas econômicas através de biotécnicas de reprodução.

O herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) é um herpesvírus membro da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus* (DAVISON et al., 2009). É um vírus envelopado, com genoma composto por uma dupla-fita de ácido desoxirribonucléico (DNA) linear (ZIMMERMANN et al., 2001), e que tem a capacidade de infectar latentemente células da linhagem monocítica (ACKERMAN, 2006). Estudos sugerem que este vírus está relacionado com diversas doenças do trato reprodutivo de bovinos (IZUMI et al., 2006; DEIM, et al., 2007; DONOFRIO et al., 2007). Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa desse vírus em amostras biológicas com potencial utilização em biotécnicas de reprodução de bovinos, com o objetivo de reduzir sua transmissão e possíveis prejuízos econômicos advindos de sua infecção.

1.1 - Objetivo geral:

- Aumentar o conhecimento sobre a distribuição do vírus BoHV-4 em líquido folicular e sêmen de bovinos no Brasil.

1.2 - Objetivos específicos:

- Aplicar a técnicas de nested-PCR em amostras de líquidos foliculares e

sêmen de bovinos para a detecção de BoHV-4;

- Sequenciar a região amplificada para a confirmação dos resultados e análise filogenética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Herpesvírus bovino tipo 4

O herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus* (DAVISON et al., 2009). Como todos os herpesvírus, os vírions do BoHV-4 são compostos de um nucleocapsídeo icosaédrico (genoma + capsídeo) montado no núcleo por pelo menos oito proteínas conservadas diferentes (BAINES, 2011). O nucleocapsídeo está envolto por uma camada proteica denominada de tegumento que é adquirida tanto no núcleo quanto no citoplasma. Já foram relatadas mais de 15 proteínas virais no tegumento dos herpesvírus, porém, a organização e a função destas proteínas ainda são, em grande parte, desconhecidas (GUO et al., 2010). Esta estrutura, nucleocapsídeo com tegumento, está finalmente contida por um envelope lipídico contendo glicoproteínas (Figura 1). Os herpesvírus codificam várias glicoproteínas do envelope, entre as quais as glicoproteínas gB, gH, gL e gM, conservadas em todos os membros da família *Herpesviridae* (HELDWEIN &

KRUMMENACHER, 2008). Na estrutura dos vírions do BoHV-4 já foram identificadas 37 proteínas virais e pelo menos 15 proteínas celulares (LÉTÉ et al., 2012).

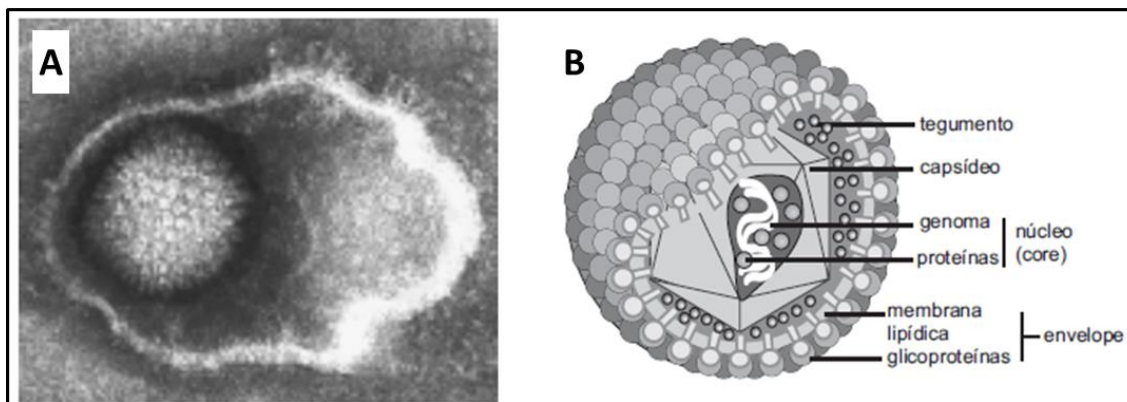


Figura 1 – Vírion modelo da família *Herpesviridae*. (A) Imagem da microscopia eletrônica do vírion do herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), o protótipo da família. (B) Esquema de um vírion da família *Herpesviridae* com indicação dos principais componentes (nucleocapsídeo, tegumento, genoma, envelope e glicoproteínas). (Fonte: FRANCO & ROEHE, 2007).

2.1.1 - Genoma

Este vírus possui um genoma composto por uma dupla-fita de ácido desoxirribonucléico (DNA), linear, de aproximadamente 144.000 pares de bases (pb) e contém aproximadamente 79 fases abertas de leitura (*Open Reading Frames*; ORF), sendo 17 destas únicas do BoHV-4 (ZIMMERMANN et al., 2001). Esta molécula é constituída de uma sequência central denominada LUR (região única longa - *Long and Unique Region*) flanqueada por diversas unidades monoméricas de DNA polirepeitivo (prDNA) (Figura 2). A LUR apresenta 108.873 pb (GENBANK, 2014) e 41% de bases G+C. Uma análise

das ORFs das regiões prDNA não encontrou nenhuma sequencia homóloga com proteínas já descritas. Porém, uma das funções do prDNA seria assegurar o acondicionamento de uma única cópia completa do DNA entre o prDNA (EHLERS et al.,1985; BROLL et al.,1999).

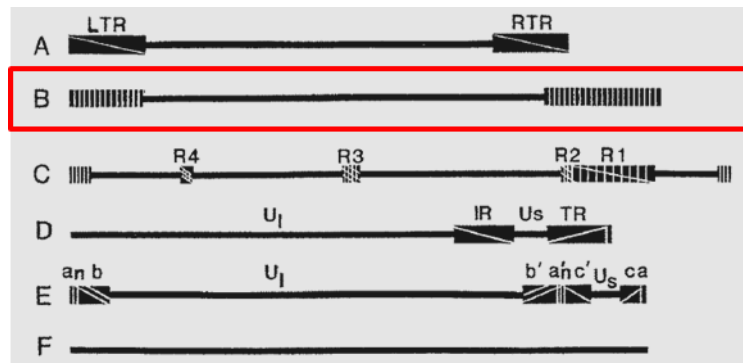


Figura 2 – Estruturas do DNA de herpesvírus. As linhas representam sequências únicas e os blocos representam sequências repetidas. Em B, destacado com o retângulo, a estrutura genômica do BoHV-4. Nas linhas A, C, D, E e F estão representadas as estruturas genômicas dos vírus herpesvírus do *Catfish*, vírus Epstein-Barr, herpesvírus bovino tipo 1, herpesvírus humano tipo 1, e herpesvírus de tupaia, respectivamente (Adaptado de ROIZMAN et al., 1992).

O gene da glicoproteína B (gB) é um dos mais conservadas entre a família de herpesvírus e homólogos de gB já foram identificados em praticamente todos os vírus dessa família (GOLTZ et al., 1994). Além disso existe a hipótese de que a função de gB pode ser conservada em todos os herpesvírus devida sua estrutura secundária, que apresenta conservação de resíduos de cisteína e prolina e da porção carboxi-terminal das proteínas (GOLTZ et al., 1994).

Já foram identificadas dez glicoproteínas nos vírions de BoHV-4 sendo a gB um dos seus principais componentes (DUBUISSON et al., 1989a). Estruturalmente, é um heterodímero constituído por duas subunidades ligadas por ligações dissulfeto. É derivada de um precursor que é glicosilado, depois clivada em um local de clivagem putativo que está presente praticamente no meio da sequência para adquirir a forma de gB madura (GOLTZ et al., 1994; LOMONTE et al., 1997).

Foi demonstrado o envolvimento desta proteína com o contato com a célula hospedeira através de interações com sulfato de heparan (VANDERPLASSCHEN et al., 1993). Também, foi comprovado que a gB é essencial para a replicação do BoHV-4 (FRANCESCHI et al., 2013).

Com base em padrões de restrição, o BoHV-4 pode ser agrupado em três genótipos: genótipo 1, que abrange as cepas tipo Movar 33/63 semelhantes a amostras isoladas no continente Europeu; genótipo 2, que abrange as cepas tipo DN 599 semelhantes a amostras isoladas nos Estados Unidos da América (EUA); e genótipo 3, que abrange amostras provenientes da Argentina (VERNA et al., 2012).

2.1.2 – Ciclo biológico

Os herpesvírus possuem dois ciclos distintos: o lítico e o latente. Durante o ciclo lítico ocorre a expressão dos genes virais, a replicação do

genoma, a produção de partículas virais infecciosas e a consequente morte da célula infectada. Já no ciclo latente, a replicação do genoma viral é interrompida e o DNA é mantido dentro do núcleo na forma episomal. Assim, não ocorre uma expressão gênica significativa e com isso o vírus é mantido na célula hospedeira sem produzir partículas virais infecciosas (DECMAN et al., 2005; FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção viral inicia-se através da interação entre glicoproteínas virais (ligantes) e glicoproteínas específicas da membrana das células (receptores), processo denominado de adsorção. Especificamente para o BoHV-4 ocorre a interação entre a glicoproteína gp8 e o receptor sulfato de heparan (VANDERPLASSCHEN et al., 1993). A adsorção é seguida pela fusão do envelope viral com a membrana celular, onde se destacam quatro glicoproteínas virais: gD, gB e um heterodímero formado pela gH e gL (LIANG et al., 1995; MEYER et al., 1998; GERDTS et al., 2000). Em seguida, o nucleocapsídeo e algumas proteínas do tegumento penetram no citoplasma das células. O DNA dos herpesvírus é replicado no núcleo da célula hospedeira utilizando tanto fatores virais como celulares. Assim, após a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira, o mesmo desloca-se para o núcleo. Através da fusão do capsídeo com a membrana nuclear, o genoma viral é transportado para dentro do núcleo, onde sua replicação irá iniciar.

A expressão das proteínas virais é controlada temporalmente

durante a infecção viral. Logo após a entrada do genoma do BoHV-4 no núcleo ocorre a expressão das proteínas alfa ou *immediate early* (IE). Essa classe de proteínas é responsável pela regulação da replicação viral. Após a síntese das proteínas IE ocorre a expressão das proteínas beta ou *early* (E), que são responsáveis pela síntese e empacotamento do DNA viral. Por fim, ocorre a expressão das proteínas gama ou *late* (L), que estão envolvidas com a formação das novas partículas virais. A expressão das proteínas L ocorre após a síntese do DNA e é regulada pela expressão das proteínas IE e E (VANDERPLASSCHEN et al., 1995).

Durante a infecção por herpesvírus, a expressão gênica celular é geralmente reprimida (GRECO et al., 2000), porém, o BoHV-4 não afeta a síntese de proteínas celulares durante o seu ciclo biológico (AUGSBURGER & METZLER, 1989). Após sua síntese, as proteínas L são encaminhadas para o núcleo, onde se inicia a morfogênese de novos vírions. No núcleo, o genoma viral é introduzido no capsídeo, formando o nucleocapsídeo, e após esse processo ocorre o brotamento através da membrana nuclear (FRANCO & ROEHE, 2007).

A passagem do vírion através da membrana nuclear ainda não está completamente elucidada. Acredita-se que existam duas vias: na primeira, o vírion adquire um envelope primário proveniente da membrana nuclear interna, e esse envelope seria perdido através da fusão com a membrana nuclear

externa, e o vírion receberia seu envelope definitivo no complexo de Golgi. Na segunda, o nucleocapsídeo seria transportado diretamente para o citoplasma, sem adquirir um envelope primário, e receberia seu envelope no complexo de Golgi. A liberação das partículas virais ocorre através da lise celular, após o nucleocapsídeo ser envelopado no complexo de Golgi (Figura 3) (ROIZMAN & KNIPE, 2001; METTENLEITER, 2002; MELANCON et al., 2004; METTENLEITER et al., 2006; FRANCO & ROEHE, 2007).

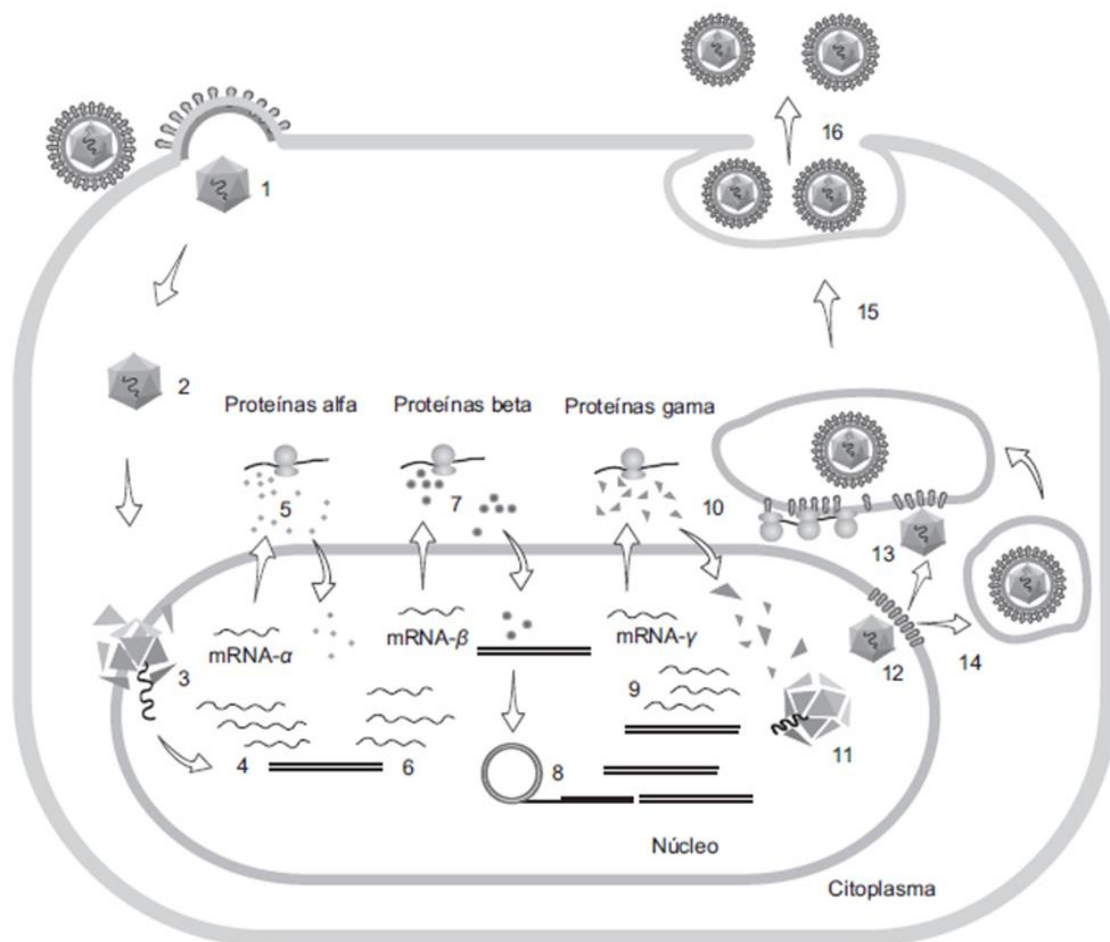


Figura 3 - Ciclo replicativo dos herpesvírus. Após a penetração do nucleocapsídeo (1) ele é transportado até o núcleo (2). Após a entrada do genoma no interior do núcleo (3) inicia-se a transcrição dos genes alfa (4) e as proteínas alfa são expressas (5). Estas proteínas ativam a transcrição dos genes beta (6) e as proteínas beta são expressas (7). Após a replicação do genoma (8) os genes gama são transcritos após a replicação do DNA (9) e as proteínas gama são expressas (10). Estas proteínas penetram no núcleo para a formação do nucleocapsídeo (11). Os nucleocapsídeos brotam através da membrana nuclear (12) e adquirem o envelope (13 e 14). Os vírions formados são transportados em vesículas até a superfície celular (15), onde são liberados por lise celular (16) (FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção latente ocorre através do bloqueio da transcrição dos genes IE logo após o genoma do BoHV-4 entrar no núcleo. Com o bloqueio da replicação viral a lise celular é diminuída e os animais latentemente infectados não apresentam sinais clínicos. Porém, o vírus latente pode ser reativado e retomar seu ciclo lítico por fatores de estresse ou tratamento com glicocorticoides (DUBUISSON et al., 1989b).

O sítio de latência do BoHV-4 são as células da linhagem monocítica (ACKERMAN, 2006). Alguns autores sugerem que o BoHV-4 também é capaz de causar latência em células do sistema nervoso central e gânglios trigêmeos (HOMAN & EASTERDAY, 1981; KROGMAN & MCADARAGH, 1982; CASTRUCCI et al., 1987a, b; NAEEM et al., 1991; CAMPOS et al., 2014). Porém, outros autores não detectaram o vírus nesses sítios (OSORIO et al., 1982; EGYED et al., 1996). Desta forma, as células da linhagem monocítica são os únicos sítios de latência confirmados do BoHV-4. Para apontar novos sítios de latência para o BoHV-4 são necessários mais estudos.

2.1.3 – Epidemiologia

O BoHV-4 foi isolado pela primeira vez na Europa a partir de bovinos com doenças respiratórias e oculares (BARTHA et al., 1966). Desde então, tem sido detectado em bovinos saudáveis e com diferentes sinais clínicos (BELAK & PALFI, 1974; GOYAL & NAEEM, 1992; EGYED et al., 1996). Este agente está mundialmente distribuído e já foi detectado em diversos países, como

Alemanha (TRUMAN et al., 1986), Suíça (METZLER & WYLER, 1986), Bélgica (VAN MALDEREN et al., 1987), Holanda (WELLENBERG et al., 1999), Espanha (MONGE et al., 2006), Japão (IZUMI et al., 2006), Turquia (BILGE-DAĞALP et al., 2007), Itália (DONOFRIO et al., 2009), Quênia, Tanzânia e África do Sul (KAMINJOLO et al., 1972; RWEYEMAMU & LORETU, 1973; THEODORIDIS, 1978), Estados Unidos (GUO et al., 1988), Argentina (PEREZ et al., 2011) e Brasil (COSTA et al., 2011; KRÜGER, 2012; CAMPOS et al., 2014).

O BoHV-4 apresenta uma peculiaridade em relação aos outros membros da subfamília *Gammaherpesvirinae*. Além de bovinos, este vírus tem a capacidade de infectar diversos hospedeiros, tanto *in vivo* como *in vitro*. Dentro desses hospedeiros, o BoHV-4 já foi isolado de algumas espécies de ruminantes tais como zebu (*Bos indicus*), bisão americano (*Bison bison*), búfalo africano (*Sincerus caffer*) e ovinos (*Ovis aries*) (TODD & STORZ, 1983; VAN OPDENBOSCH et al., 1986; MORENO-LOPEZ et al., 1989; ROSSITER et al., 1989). Além desses hospedeiros, já foram relatados isolamentos esporádicos em leões (*Panthera leo*), gatos (*Felis catus*), e macacos (*Aotus trivirgatus*), e experimentalmente, o BoHV-4 foi capaz de infectar cabras, porcos da Índia e coelhos (EGYED et al., 1997). *In vitro*, o BoHV-4 é capaz de se replicar em células de cultivo primário ou de linhagens de diferentes espécies de animais, inclusive de humanos, como por exemplo células embrionárias de pulmão

(MRC-5 e WI-38) e células gigantes de glioblastoma (EGYED, 1998; GILLET et al., 2004).

2.1.4 – Associação com patologias

A primeira relação entre o BoHV-4 e uma patologia ocorreu em 1973, quando Parks e Kendrick sugeriram a associação entre BoHV-4 e infecção uterina, isolando este vírus a partir de uma amostra de um animal com metrite pós-parto. Na Itália, o BoHV-4 foi isolado em um rebanho leiteiro que apresentava problemas de metrite pós-parto, vulvovaginite pustular, abortos, natimortos e infertilidade (CASTRUCCI et al., 1986). Na Bélgica, a soroprevalência do BoHV-4 foi associada à metrite pós-parto e à infertilidade crônica (DONOFRIO et al., 2007). Além desses, outros estudos relataram o isolamento deste vírus a partir de animais com metrite em diferentes países, como por exemplo, nos Estados Unidos (EVERMANN et al., 1985; FRAZIER et al., 2001), Bélgica (WELLEMANS et al., 1989; VAN OPDENBOSCH et al., 1988), Espanha (MONGE et al., 2006), e Hungria (EGYED et al., 2011).

O exato papel do BoHV-4 como agente etiológico da metrite em bovinos não está bem claro. Foi sugerido que o BoHV-4 possui tropismo por células epiteliais e do estroma uterino (DONOFRIO et al., 2007). Logo, o vírus apresenta potencial de destruição das células que compõe esse tecido, à medida que ocorre o ciclo lítico da infecção (DONOFRIO et al., 2007). Por outro lado, ele também é capaz de infectar latentemente células monocíticas, as

quais podem ser atraídas para o local por estímulos externos. Por exemplo, foi demonstrado que o vírus induz a secreção de prostaglandina E (PGE), que está relacionada com a reativação do vírus em macrófagos (DONOFRIO et al., 2007). Tanto a PGE quanto a *Escherichia coli* (agente de metrites bacterianas) ativam o promotor do gene alfa IE 2 do BoHV-4, o qual estimula a replicação viral. Essa interação pode causar um ciclo de *feedback* positivo entre a infecção bacteriana, a secreção de PGE e a replicação do BoHV-4 (DONOFRIO et al., 2008). Dessa forma, o vírus latente poderia ser reativado a partir de macrófagos provenientes da corrente sanguínea para infectar as células do endométrio (DONOFRIO et al., 2007; 2008).

Em 1989, Wellemans e Van Opdenbosch sugeriram a associação do BoHV-4 com aborto. No estudo desenvolvido por eles, foi relatado o isolamento do vírus a partir de amostras de abomaso e da placenta de fetos abortados. No mesmo trabalho foi também demonstrada a presença de anticorpos anti-BoHV-4 nas progenitoras desses fetos. Além disso, trabalhos mais recentes demonstraram a presença do genoma viral em diversas células placentárias (DEIM et al., 2006) e em diversos tecidos de fetos abortados (DEIM et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que a transmissão intrauterina do BoHV-4 pode ocorrer (EGYED et al., 2011). No mesmo estudo, Egyed e colaboradores detectaram o genoma do BoHV-4 em sêmen (espermatozoide, células epiteliais e granulócitos), indicando que a via sexual de transmissão

pode ocorrer entre bovinos.

Na Holanda, sugeriu-se a associação do BoHV-4 com mastite (WELLENBERG et al., 2000). Porém, foi concluído que o vírus não participa da patogênese da mastite e sim, influencia na severidade e a duração da patologia. A infecção bacteriana responsável pela mastite, promove a reativação viral, e com isso o BoHV-4 influencia a evolução da doença (KÁLMÁN et al., 2004). Contudo, não se pode descartar que o BoHV-4 possua tropismo pelo tecido mamário; já foi demonstrada a presença do DNA viral em células epiteliais dos ductos do úbere em vacas com mastite clínica, bem como a presença de partículas virais infecciosas no leite (IZUMI et al., 2006).

Além das associações acima citadas, sugere-se que o BoHV-4 pode estar relacionado a outras patologias. Como por exemplo, doenças do trato digestivo, uma vez que o vírus foi isolado a partir de fezes diarreicas de bovinos (EUGSTER, 1979), de glossite ulcerosa e lesões linguais (RWEYEMAMU & LORETU, 1973; LUINI et al., 1985; CAVIRANI et al., 1990). Além disso, o vírus tem sido isolado associado à ceratoconjuntivite aguda (BARTHA et al., 1966); doenças respiratórias caracterizadas por secreção nasal, tosse, hiperpneia e dispneia (MOHANTY et al., 1971); orquite e epididimite (THIRY et al., 1981); e infertilidade (GÜR & DOGAN, 2010).

2.1.5 – Diagnóstico

Para o diagnóstico laboratorial do BoHV-4 podem ser utilizadas técnicas variadas, como isolamento viral, testes sorológicos, imunohistoquímica, e identificação do DNA viral por técnicas moleculares. As amostras clínicas utilizadas são amostras de secreções uterinas, oculares e nasais, fragmentos de órgãos e crostas da epiderme. Como visto anteriormente, o BoHV-4 apresenta a peculiaridade de se multiplicar em diversos tipos celulares de cultivo primário ou de linhagens celulares, como por exemplo células fetais de pulmão de ovinos (*ovine fetal lung*; OFL), células pulmonares de vison (*mink lung*; ML) e células de rim de bovinos (*Madin-Darby bovine kidney*; MDBK).

Outro método para o diagnóstico de BoHV-4 é a pesquisa de anticorpos anti-BoHV-4. Estes podem ser detectados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) e imunoperoxidase. É importante salientar que a soroconversão ocorre entre 14 e 20 dias após a infecção primária, e que geralmente o título de anticorpos do animal soropositivo é baixo (MONGE et al., 2006). Recentemente, um ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos anti-BoHV-4 foi desenvolvido com isolados brasileiros (KRÜGER et al., 2012).

A principal técnica utilizada para a detecção e identificação do genoma viral ou fragmentos genômicos deste vírus é a reação em cadeia da

polimerase (PCR) (VAN ENGELENBURG et al., 1993; ASHBAUGH et al., 1997). Esta técnica apresenta alta sensibilidade, alta especificidade, pode ser aplicada em diversas amostras clínicas e tem a capacidade de detectar o vírus mesmo quando este estiver desenvolvendo infecção latente (DEBIASI & TYLER, 2004). A aplicação da técnica de PCR para a detecção do genoma de BoHV-4 é bastante difundida e há diversas técnicas padronizadas tendo como alvo diferentes fragmentos do genoma (DONOFRIO et al., 2000; NIKOLIN et al., 2007). Entre os principais alvos destacam-se os presentes no gene que codifica a glicoproteína B (BOERNER et al.; 1999; WELLENBERG et al., 2000; FRAZIER et al.; 2002; MONGE et al., 2006; CAMPOS et al., 2014) e a timidina quinase (EGYED et al., 1996; EGYED & BARTHA, 1998; YAMAMOTO et al., 2000; ASANO et al., 2003; IZUMI et al., 2006). Porém, o número de cópias virais presentes nas amostras clínicas de animais pode estar abaixo do limite de detecção da PCR.

Para que a detecção do genoma viral seja feita de maneira adequada é importante que a técnica apresente uma sensibilidade alta (VAN ENGELENBURG et al., 1993; EGYED & BARTHA, 1998). Uma estratégia para aumentar a sensibilidade da técnica é a utilização de uma PCR seguida por uma *nested* (nPCR), que aumenta a sensibilidade do diagnóstico devido ao aumento do número total de ciclos de amplificação (CAMPOS et al., 2014). Outra técnica com alta sensibilidade utilizada para a detecção de BoHV-4 é a

PCR em tempo real (qPCR). Além de apresentar alta sensibilidade esta técnica é capaz de determinar o número de cópias do genoma presente na amostra clínica (EGYED et al., 2011).

2.2 – Importância da presença de vírus em amostras de líquido folicular e sêmen

O Brasil possui um rebanho de bovinos de mais de 211 milhões de cabeças, sendo considerado o segundo maior rebanho comercial do mundo. No ano de 2013 foram abatidas aproximadamente 34 milhões de cabeças, sendo que grande parte dessas foi destinada à exportação (IBGE, 2014). O país vem melhorando a qualidade do seu rebanho ao longo do tempo devido ao aprimoramento de vários aspectos da criação de bovinos, e se destaca mundialmente pelo aumento da produção de leite e carne bovina (THIBIER, 2002 e 2006). Dentre os aspectos que vem evoluindo com a qualidade do rebanho é o melhoramento genético através da aplicação de biotécnicas de reprodução. Dentre essas se destacam a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões (VIEIRA, 2012).

Estima-se que no ano de 2013 foram comercializadas 14 milhões de doses de sêmen no país, sendo que pouco mais de 50% destas foram provenientes do mercado nacional. Além disso, o país exportou mais de 180 mil doses de sêmen, principalmente para a Colômbia, Paraguai e Canadá

(ASBIA, 2013).

Por outro lado, diversos ovários e ovidutos bovinos utilizados na produção de embriões *in vitro* são provenientes de animais com estado sanitário desconhecido, colhidos em abatedouros (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000). As amostras de ovários e de líquidos foliculares coletadas são enviadas a laboratórios especializados na fertilização *in vitro* para serem manipuladas. Neste processo de manipulação, líquidos foliculares de animais infectados com vírus que apresentam tropismo por tecidos do aparelho reprodutor de bovinos podem contaminar o material coletado de animais não infectados. Dessa forma, pode ocorrer a infecção do embrião, com consequente redução nas taxas de maturação, fertilização e desenvolvimento, e infecção do animal receptor (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000; KAFI et al., 2010).

O BoHV-4 pode estar relacionado com diversas patologias do sistema reprodutivo (ver item 2.1.5). Assim, a infecção por este vírus pode comprometer diretamente os desempenhos produtivo e reprodutivo dos animais infectados, causando perdas econômicas significativas à produção de bovinos, podendo afetar a produção e comercialização de embriões *in vitro* e *in vivo*, e de sêmen (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000).

Diversos estudos já demonstraram a presença de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) em sêmen e líquido folicular de bovinos

(MARLEY et al., 2008; DIALLO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Visando o controle da presença de herpesvírus em sêmen e, no caso de produção *in vitro* de embriões, em líquido folicular, as pesquisas têm utilizado diferentes estratégias diagnósticas. Técnicas clássicas, como isolamento viral e imunofluorescência, são acompanhadas de técnicas mais modernas, principalmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a nPCR e a qPCR (DIALLO et al., 2011; LADELFA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Essas técnicas possibilitam a identificação de amostras/animais infectados por BoHV-4 e, com sua consequente eliminação, permite a redução de prejuízos econômicos associados à reprodução de bovinos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Amostras

3.1.1- Coleta de ovários e líquido folicular

Foram coletados 119 pares de ovários de fêmeas abatidas em frigorífico localizado na região central do Rio Grande do Sul. Os animais eram provenientes de diferentes propriedades da região centro-sul do Estado. Os líquidos foliculares foram aspirados e agrupados em “pool” por par de ovários, obtendo-se assim um volume aproximado de 1,5 mL de líquido folicular (LF) por animal, depositados em tubos de 1,5 mL. As amostras foram coletadas e cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. As alíquotas foram mantidas como uma mistura de células e líquido folicular, sendo armazenadas em freezer à -70°C até o seu processamento.

3.1.2 - Coleta de Sêmen

Foram obtidas 164 amostras de sêmen bovino coletadas a partir de

touros. Destas, 63 amostras foram provenientes de centros de inseminação artificial do estado do Rio Grande do Sul e 101 amostras de animais provenientes de cabanhas de touros do estado de Goiás. O material foi armazenado em tubos de 1,5 mL, mantido em freezer à -70°C até o seu processamento.

3.2 - Extração de ácidos nucléicos

3.2.1 - Extração de DNA de líquidos foliculares

A extração de DNA de líquido folicular foi realizada com fenol seguindo o protocolo de Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. Cem microlitros de LF foram misturados com uma solução de lise contendo 800 µL TE⁵N 2x [Tris 20 mM, pH 7,5 (Invitrogen); EDTA 10 mM (Invitrogen); NaCl 5 M (Nuclear)], 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS 10%, Promega) e 3 µL de Proteinase K (20 mg/mL, USB Corporation), e incubada em banho-maria a 37°C por 1 h. Após, o material foi centrifugado por 10 min a 8765 x g. Foram transferidos para um novo tubo 400 µL do sobrenadante, no qual foram adicionados 300 µL de fenol tamponado (pH 8,0, Invitrogen) e 15 µL de NaCl (5M, Nuclear). Após agitação por 30 min à temperatura ambiente, o material foi centrifugado por 15 min a 8765 x g. O sobrenadante foi coletado e a ele foram adicionados 2,5 x volumes de etanol absoluto (Synth). O tubo foi levemente invertido para mistura das soluções e armazenado a -20°C por 30 min. Nova centrifugação de 15 min a 8765 x g foi realizada, formando um *pellet*

de DNA, o qual foi ressuspensionado em 30 µL de TE [Tris 10 mM, pH 7,5 (Invitrogen); EDTA 1 mM (Invitrogen)]. Por último, foram adicionados 5 µL de RNase (Fermentas) e o material foi incubado a 37°C por 30 min. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

3.2.2 - Extração de DNA de sêmen

A extração de DNA de sêmen foi realizada segundo Van Engelenburg et al. (1993) e Smits et al. (2000), com algumas modificações. Microtubos contendo 50 µL de sêmen foram centrifugados a 8500 x *g* por 10 minutos. Após, foi adicionado 150 µL de TE e 27,5 µL de uma solução de lise [22 µL de SDS 10% (Promega), 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL, USB Corporation) e 0,5 µL de RNA transportador (tRNA) (10,3 mg/mL, Sigma)]. O material foi incubado em banho-maria a 56°C por 1 h. Posteriormente, foram adicionados 220 µL de fenol tamponado (pH 8,0, Invitrogen) e 27 µL de NaCl (5M, Nuclear). Após agitação por 30 min à 37°C, o material foi centrifugado por 12 min a 8500 x *g*. O sobrenadante foi coletado e a ele foram adicionados 0,6 x volumes de isopropanol absoluto (Dinâmica). Após incubação a -20°C por 30 min, as amostras foram novamente centrifugadas por 20 min a 8500 x *g*. O isopropanol foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado em 100 µL de TE. Foi adicionado 1 mL de n-butanol (Vetec). O material foi agitado e centrifugado por 10 min a 8500 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de TE. Por último, foram adicionados 5 µL de RNase (Fermentas) e o

tubo foi incubado a 37°C por 30 min. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

3.3 - Reações em cadeia da polimerase (PCRs)

Os ensaios de PCR e nPCR utilizados seguiram o protocolo de Campos et al. (2014). A primeira reação para a amplificação do genoma do BoHV-4 foi realizada com os oligonucleotídeos PF 5' CCCTTCTTTACCACCACCTACA 3' e PR 5' TGCCATAGCAGAGAAACAATGA 3', que anelam em regiões conservadas do gene da glicoproteína B (gB), amplificando um produto de 615 pb (Figura 4) (WELLENBERG et al., 2001). As reações foram realizadas como previamente descrito por Campos et al. (2014): um total de 25 µL contendo 100 ng de DNA total, 1 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 µM de cada oligonucleotídeos (IDT), 10% dimetilsulfóxido (DMSO; Acros Organics), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10% de PCR buffer (Invitrogen) e 0.4 mM de dNTPs (ABgene) por reação. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf®), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 50 seg a 94°C para desnaturação, 50 seg a 59°C para o anelamento dos oligonucleotídeos, 50 seg a 72°C para a extensão; e uma extensão final por 3 min a 72°C.

A nPCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos PF 5'-CAACAACATCAACAAGCAAGC -3' e PR 5'-GACCACCCTCTGTAAACTG -3', que geram um produto de 364 pb (Figura 4). Foi utilizado 1 µL da primeira

reação em um mix como descrito anteriormente. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 50 seg a 94°C para desnaturação, 50 seg a 58°C para o anelamento dos oligonucleotídeos, 50 seg a 72°C para a extensão; e uma extensão final por 3 min a 72°C (CAMPOS et al., 2014).

11381 CCCTTCTTTACCACCACCTACA^aGTTGACTAGCCATAAAAATGTATTATAA
 11431 GACTATCTTATTCTTCGCTCTAATTAAGGTATGCAGTTTCAACCAGACCA
 11481 CTACACACTCAACCACAACCTCACCAAGTATTTTCATCAACCACCTCTTCC
 11531 ACAACAACATCAACAAGCAAGC^bCATCAAACACAACCTCAACAAATAGTTC
 11581 ATTAGCTGCCTCTCCCCAGAACACGTCAACAAGCAAGCCATCCACTGATA
 11631 ATCAGGGTACCAGTACCCCCACTATTCCAAGTGTACTGATGACACAGCC
 11681 AGTAAAAATTTTTATAAATACAGAGTATGCAGTGCATCATCTTCCTCTGG
 11731 AGAACTATTCAGATTTGACCTTGATCAGACATGTCCAGATACAAAAGATA
 11781 AAAAACATGTGGAAGGCATCCTGCTGGTACTAAAAAGAATATTGTCCCA
 11831 TACATCTTCAAAGTGAGGAAATATAGAAAAATTGCCACCTCAGTGACCAGT
 11881 TTACAGAGGGTGGTC^cCCAGGCAGCTGTTACCAATAGGGATGATATCAGCA
 11931GAGCCATACCCTATAATGAAATTTCAATGATAGATAGGACCTATCATTGT
 11981 TTCTCTGCTATGGCA^d

Figura 4 – Sequências genômica de BoHV-4 amplificadas pela PCR e nPCR neste trabalho. A região amplificada pela PCR é delimitada pelas sequências sublinhadas destacadas com as letras “a” (posição 11381 a 11402) e “d” (posição 11974 a 11995), enquanto que a região amplificada pela nPCR é delimitada pelas sequências sublinhadas destacadas com as letras “b” (posição 11533 a 11552) e “c” (posição 11877 a 11895). Os números representam a posição da sequência dentro do genoma do BoHV-4. Foi utilizada como base a sequência com número de acesso AF318573 do GenBank (GENBANK, 2014).

^aOligonucleotídeo *forward PCR*. Posição 11381 a 11402.

^bOligonucleotídeo *forward nPCR*. Posição 11533 a 11552.

^cOligonucleotídeo *reverse nPCR*. Posição 11877 a 11895

^dOligonucleotídeo *reverse PCR*. Posição 11974 a 11995

Em cada reação de PCR, 25 moléculas de controle interno (CI) foram adicionadas para evitar reações falso-negativas. O CI foi produzido através da clonagem de um fragmento produzido por uma reação de PCR sob condições de baixo rigor [temperatura de anelamento de 50°C e alta concentração de MgCl₂ (2 mM)]. O CI tem tamanho menor (322 pb) quando

comparado com o amplicon esperado, apresenta a sequências dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* da reação de PCR, e através da análise pelo software BLAST apresentou similaridade com sequências de *Bos taurus* (Figura 5) (CAMPOS et al., 2014).

**CCCTTCTTTACCACCACCTACA^aGTCGATAGGTGTGCAATATGCTACTGGAGCAGAG
CAGAGAAATAGCTACAGAAAGAATGAAGAGGCTGAGCCAAAGCAGAAATGGCAC
ACAGTTGTGTTTGTCTGATGGTGAAGTAAAGTCCAACACTGTAAAGAATAATATTG
CAAAGGAACCTGTAAGGTCCATGAATCAAGGTAAATTGGATGTGGTCAAACAGGA
GATGGCAAGAACAACATGGATCAAGGTAAATTGGATGTGGTCAAACAGGAGATG
GCAAGAACAACATCCACATTTTAGGAATCAGTGAACATAAAATGGATGGGAATGG
GTGAATTTAATTCAGATGATTCATTGTTTCTCTGCTATGGCA^b**

Figura 5 – Sequência do controle interno. Sequência do controle interno com a identificação dos oligonucleotídeos sublinhados e destacados com as letras “a” e “b” (Adaptado de CAMPOS et al., 2014).

^aOligonucleotídeo *forward*.

^bOligonucleotídeo *reverse*.

Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL, Promega). A sensibilidade da detecção calculada é de 2,5 a 25 moléculas de DNA viral (Figura 6) (CAMPOS et al., 2014).

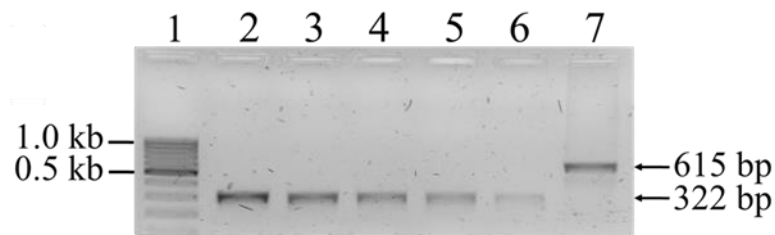


Figura 6 – Sensibilidade da reação de amplificação genômica do BoHV-4. Titulação do CI de BoHV-4 usando quantidades definidas de moléculas. Uma série de diluições na base 10 foi amplificada e 5 μ L da reação de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O número total de moléculas de CI adicionados à reação foi de $2,5 \times 10^5$ (coluna 2), $2,5 \times 10^4$ (coluna 3), $2,5 \times 10^3$ (coluna 4), $2,5 \times 10^2$ (coluna 5), $2,5 \times 10^1$ (colunas 6 e 7). A coluna 1 é o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (BioLabs). Na coluna 7 incluiu-se 200 ng de DNA extraído a partir da amostra MOVAR crescido em células MDBK. O tamanho do CI de BoHV-4 é 322 pb e o do fragmento alvo da PCR é 615 pb (Adaptado de CAMPOS et al., 2014).

Para evitar a contaminação com produtos de PCR, algumas medidas foram adotadas: salas isoladas foram utilizados para a preparação do mix da PCR e nPCR, para a preparação das reações de PCR e nPCR, para a extração de DNA e para as análises dos produtos de PCR; ponteiras com filtro foram utilizadas em todos os procedimentos; os fluxos laminares utilizados para a preparação do mix e preparação das reações foram descontaminados com luz UV e as bancadas de trabalho com etanol; e controles negativos foram incluídos a cada dez reações de PCR. Também, foi adicionado controle positivo a cada dez reações, obtido através da extração do DNA da amostra MOVAR cultivada em células MDBK.

3.4. Sequenciamento e análise filogenética

Produtos da nPCR com tamanho esperado para BoHV-4 (364 pb) foram clonados no vetor pCRTM 2.1 vector (TOPO[®] TA Cloning[®] kit, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Os vetores com o inserto foram submetidos ao sequenciamento visando a confirmação dos resultados. Para isso foi utilizado o *DYEnamic ET terminators sequencing kit* (GE Healthcare, Giles, United Kingdom), seguindo as recomendações do fabricante. As sequências de nucleotídeos foram determinadas por uso de um sequenciador automático MegaBACE 500 (GE Healthcare). Cada produto foi sequenciado 2 vezes em ambos os sentidos utilizando os oligonucleotídeos descritos anteriormente. As sequências obtidas foram analisadas utilizando os softwares BioEdit package 7.0.5, Vector NTI 8.0, e Sequence Scanner Version 1.10 (Copyright Applied Biosystems, 2005). Posteriormente, a análise da homologia das sequências foi realizada utilizando o software BLAST e os alinhamentos foram realizados utilizando o software Clustal W, versão 2.0 utilizando os parâmetros padrão (LARKIN et al., 2007). As análises filogenéticas foram realizadas com o software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A história evolutiva foi inferida por meio do método de *Maximum Likelihood* utilizando 1000 repetições.

4. RESULTADOS

4.1 – Detecção de BoHV-4 em amostras de líquido folicular e sêmen

Cento e dezenove amostras de líquidos foliculares e 164 amostras de sêmen foram processadas e submetidas à primeira reação de PCR para BoHV-4, para a amplificação do produto-alvo e do controle interno (Figura 7). Após, os produtos dessa reação foram submetidos à nPCRs específica para o BoHV-4 (Figura 8). Do total de 119 amostras de líquido folicular, foi detectada a presença de DNA de BoHV-4 em 2 amostras (1,68%). Das 164 amostras de sêmen, 14 (8,54%) apresentaram a presença do DNA de BoHV-4. Destas, 2 amostras foram provenientes de centro de inseminação artificial do Rio Grande do Sul, representando 3,17% das 63 amostras, e 12 amostras foram provenientes de cabanhas do estado de Goiás, representando 11,88% das 101 amostras.

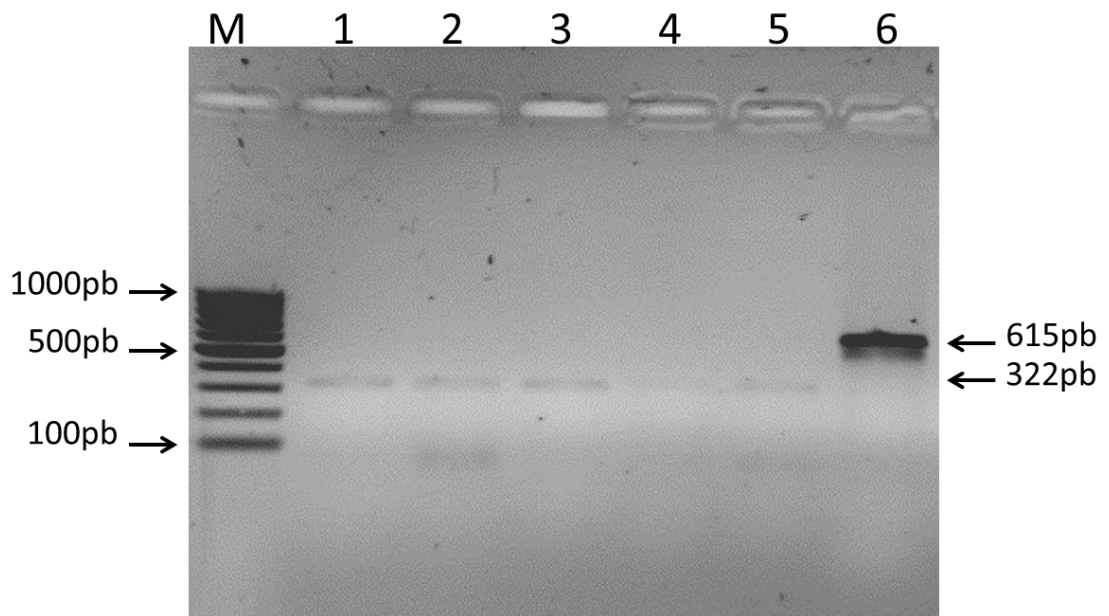


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos da PCR. Análise da amplificação da reação de PCR para BoHV-4 por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %. Coluna 1 e 2: Amostras de DNA extraídas de sêmen. Coluna 3 e 4: Amostras de DNA extraídas de líquido folicular. Coluna 5: Controle negativo. Coluna 6: Controle positivo (DNA extraído a partir da amostra MOVAR cultivada em células MDBK). A coluna M é o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (BioLabs). O tamanho do fragmento do CI de BoHV-4 é 322 pb e o do fragmento alvo da PCR é 615 pb.

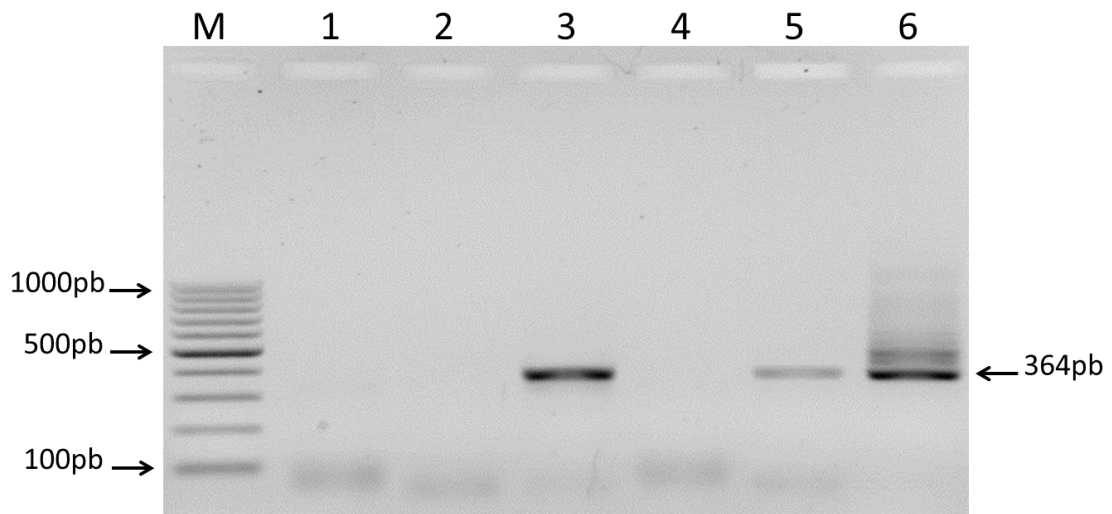


Figura 8 – Resultado da reação de nPCR. Análise da amplificação da reação de nPCR para BoHV-4 por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Coluna 1: Controle negativo amplificado a partir de 1 μ L da amostras da coluna 5 da figura 7. Coluna 2 e 3: Representam as amostras de DNA extraídas de sêmen amplificadas a partir de 1 μ L das amostras da coluna 1 e 2 da figura 7 respectivamente. Coluna 4 e 5: Representam as amostras de DNA extraídas de líquido folicular amplificadas a partir de 1 μ L das amostras da coluna 3 e 4 da figura 7 respectivamente. Coluna 6: Controle positivo amplificado a partir de 1 μ L da amostras da coluna 5 da figura 7. A coluna M é o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (BioLabs). O tamanho do fragmento alvo da PCR é 364 pb.

4.2 – Análise filogenética

Os produtos de PCR de sete amostras positivas para BoHV-4 foram submetidos ao sequenciamento para confirmação da identidade das amplificações e análise filogenética. O resultado do sequenciamento e a análise filogenética revelaram que os produtos amplificados pela nPCR

correspondiam a BoHV-4 (Figura 9).

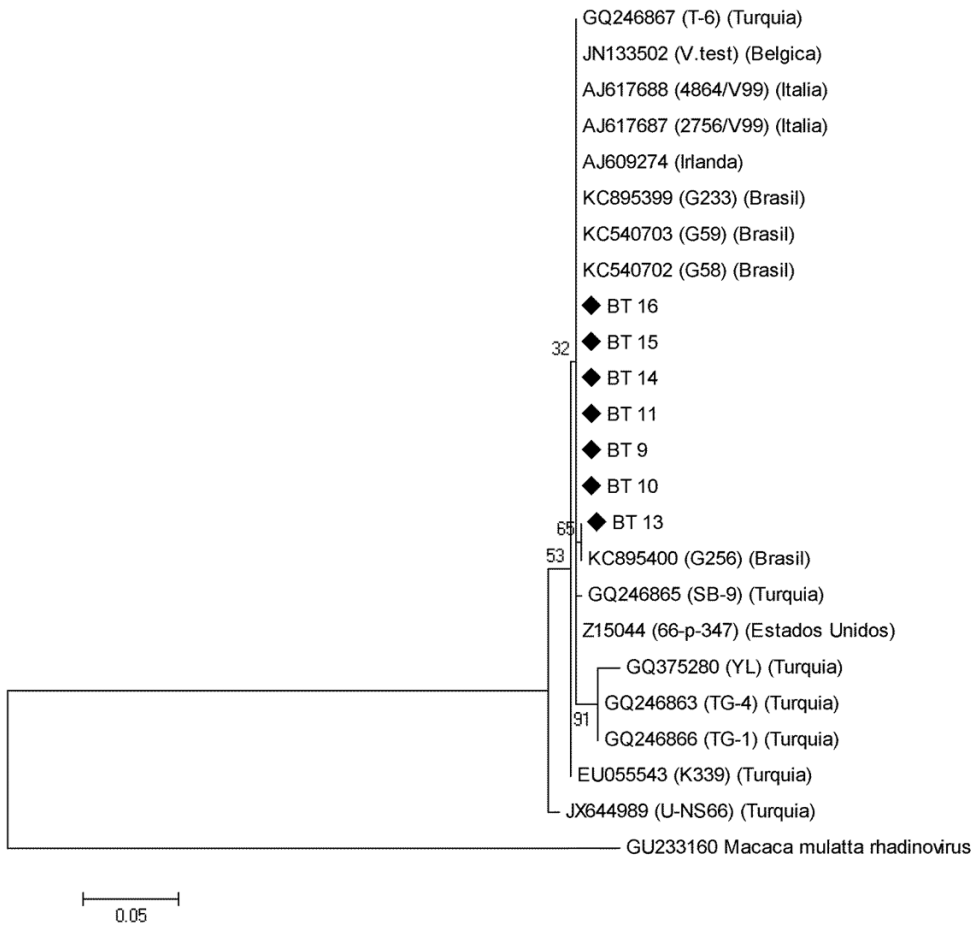


Figura 9 – Árvore filogenética de BoHV-4. Análise filogenética de sete amplicons de BoHV-4 obtidos nesse estudo, destacados com o losango preto (◆), com 16 sequências depositadas no banco de dados GenBank. A análise demonstra que as amostras amplificadas nesse estudo correspondem ao BoHV-4. O radinovírus de *Macaca mulatta* foi utilizado como *out-group*.

5. DISCUSSÃO

5.1 – Detecção de BoHV-4 em líquidos foliculares

Os ovários e ovidutos bovinos utilizados na produção de embriões *in vitro* são geralmente coletados de animais com estado sanitário desconhecido, colhidos em abatedouros (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000). Dessa forma, podem apresentar agentes infectantes capazes de causar perdas econômicas através da redução nas taxas de maturação, fertilização e desenvolvimento do embrião, e infecção do animal receptor (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000; KAFI et al., 2010). Sugere-se que o herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) esteja envolvido em diversas patologias do trato reprodutivo de bovinos (IZUMI et al., 2006; DEIM, et al., 2007; DONOFRIO et al., 2007), além de possivelmente possuir tropismo por células epiteliais e do estroma uterino (DONOFRIO et al., 2007), e assim, pode estar sendo disseminado através de biotécnicas de reprodução de bovinos..

Cento e dezenove amostras de líquido folicular de bovinos coletadas

a partir de um “pool” do par de ovários em abatedouros foram submetidas à nPCR para a detecção do genoma do BoHV-4. Destas, duas (1,68 %) apresentaram a amplificação do fragmento de 364 pb. Através da análise da sequência de nucleotídeos obtida foi confirmado que os fragmentos amplificados eram de BoHV-4. Esse é o primeiro relato de presença do DNA de BoHV-4 em amostras de líquido folicular de bovinos no Brasil e esses resultados corroboram dados publicados anteriormente que demonstravam a presença do BoHV-4 na forma latente em gânglios trigêmeos de bovinos no Brasil (CAMPOS et al., 2014). Apesar de que o objetivo do presente estudo não foi determinar a frequência de infecções pelo BoHV-4 no rebanho bovino brasileiro, os resultados aqui obtidos sugerem que há circulação desse vírus nos animais coletados, o que pode sugerir que esse vírus desempenhe um papel em desordens reprodutivas de bovinos no Brasil. Essa hipótese terá que ser testada de forma mais detalhada e extensiva em estudos futuros.

Uma vez que os ovários utilizados na reprodução artificial de bovinos podem ser obtidos a partir de animais com estado sanitário desconhecido, este agente pode estar sendo transmitido através das técnicas de reprodução de bovinos. Segundo o subcomitê de pesquisa da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o tratamento com tripsina diminui a transmissão de vírus apenas para embriões produzidos *in vivo*. Para embriões produzidos *in vitro* este tratamento não é eficaz para a eliminação de vírus

associados ao oócito e o risco de transmissão para o embrião é maior (KRAMPS, 2009). Porém, apenas a detecção do genoma viral não significa a presença de partículas virais infecciosas. São necessários estudos futuros para elucidar a transmissão de BoHV-4 através de ovários e ovidutos utilizados na produção *in vitro* de embriões.

5.2 – Detecção de BoHV-4 em sêmen

Cento e sessenta e quatro amostras de sêmen bovino de diferentes centros de inseminação artificial foram submetidas à nPCR para a detecção do genoma do BoHV-4. Destas, 14 (8,54%) apresentaram a amplificação do fragmento de altura esperada para o BoHV-4. Houve uma diferença no percentual encontrado em amostras de centro de inseminação artificial do Rio Grande do Sul e das amostras de cabanhas do estado de Goiás. Enquanto que das 63 amostras provenientes de centro de inseminação artificial 3,17% foram positivas, das 101 amostras provenientes de cabanhas 11,88% foram positivas. A diferença pode ser justificada pelo fato de que sêmens destinados a comercialização são provenientes de animais com um controle sanitário mais rigoroso do que o sêmen de touros provenientes de cabanhas.

O resultado obtido reforça os achados de estudos anteriores. Na Sérvia, 18 amostras de sêmen de touros destinados a reprodução artificial com anticorpos anti-BoHV4 detectados por ELISA foram submetidas a uma nPCR para a detecção do DNA de BoHV-4. Neste trabalho, apenas uma demonstrou

a presença do DNA viral (NIKOLIN et al., 2008). No mesmo estudo foi realizada a tentativa de isolamento viral dessa amostra, mas os autores não conseguiram isolar o vírus, talvez, por usarem sêmen diluído, o que diminuiria o número de partículas virais na amostra (NIKOLIN et al., 2008). Na Argentina, foram testadas 70 amostras criopreservadas de sêmen de centros de inseminação artificial de bovinos por PCR e nPCR. O DNA de BoHV-4 foi detectado em 3 (4,3 %) amostras, apenas quando a técnica de nPCR foi utilizada, demonstrando a importância da utilização de uma técnica com alta sensibilidade para a detecção de BoHV-4 em sêmen (MORÁN et al., 2013). Os autores submeteram as amostras positivas ao isolamento viral, e o BoHV-4 foi isolado das três amostras, sugerindo que o BoHV-4 pode ser transmitido por via sexual ou por inseminação artificial. Os dois estudos também utilizaram sêmens de centros de inseminação artificial, de animais aparentemente saudáveis. Mesmo que em baixa ocorrência, as alíquotas de sêmen destinadas à inseminação artificial necessitam de um controle para evitar uma possível disseminação do BoHV-4 entre os rebanhos bovinos e consequentes prejuízos econômicos.

5.3 – Nested PCR utilizada para a detecção de BoHV-4

A técnica aqui utilizada foi padronizada por Campos e colaboradores (2014) e possui uma sensibilidade de detecção de 25 moléculas. Após a análise em gel de agarose a 1,5 %, foi reforçada a importância da utilização de

uma técnica com alta sensibilidade para a detecção de BoHV-4, pois não foram observados amplicons a partir das amostras clínicas após a primeira reação de amplificação. Como o controle positivo é uma amostra de uma cepa cultivada em células MDBK, o número de moléculas é muito superior à quantidade encontrada em amostras clínicas. Ao analisar os produtos da segunda reação, podemos visualizar a presença de fragmentos de DNA de tamanho esperado para o BoHV-4. A necessidade de utilizar uma reação com alta sensibilidade já havia sido demonstrada por Morán e colaboradores (2013). Morán e colaboradores utilizaram uma nPCR descrita por Egyed e colaboradores (1996), e a sensibilidade da primeira reação é em torno de 100 moléculas. Assim, a técnica desenvolvida por Campos e colaboradores (2014), é aproximadamente 4 vezes mais sensível que a utilizada por Morán e colaboradores (2013). Considerando a aplicação da nPCR, a sensibilidade das duas técnicas citadas pode ser ainda menor, uma vez que mesmo não aparecendo bandas visíveis na primeira reação (Figura 7), aparecerão bandas visíveis na segunda reação (Figura 8). Considerando os resultados de sensibilidade de detecção obtidos, concluímos que a nPCR utilizada neste estudo pode ser considerada como uma ferramenta eficiente e rápida para a análise de sêmen e líquidos foliculares de bovinos.

5.4 – Análise filogenética das amostras de BoHV-4

Sete fragmentos de 364 pb foram purificados do gel de agarose,

clonados e submetidos ao sequenciamento. O resultado do sequenciamento e da análise através do software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011) demonstrou que a região amplificada por essa reação é conservada entre as amostras de BoHV-4 comparadas e confirmou que os *amplicons* obtidos são de BoHV-4. Uma primeira análise mostrou a semelhança dessas amostras com amostras brasileiras obtidas a partir de gânglios trigêmeos (CAMPOS et al., 2014). Porém, todas as amostras apresentaram uma alteração de um único nucleotídeo, guanina por timina, na posição 225 da sequência obtida em relação às amostras brasileiras. Essa mutação gera uma alteração de uma glutamina por uma histidina na posição 75 quando é feita a dedução de aminoácidos das sequências obtidas. Além disso, a amostra BT 13 apresentou a mesma mutação que a amostra 6256 (KC8954000), o que gera a troca de uma valina por uma alanina na posição 86 das sequências obtidas.

6. CONCLUSÕES

a) DNA de herpesvírus bovino tipo 4 foi encontrado, pela primeira vez em líquidos foliculares de bovinos;

b) DNA de herpesvírus bovino tipo 4 foi encontrado em sêmen de bovinos destinados a inseminação artificial do Rio Grande do Sul e de bovinos provenientes de cabanhas do estado de Goiás.

7. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. **Vet. Microbiol.**, v.113, p.211-222, 2006.

ASANO, A.; INOSHIMA, Y.; MURAKAMI, K.; IKETANI, Y.; YAMAMOTO, Y.; SENTSU, H. Latency and persistence of Bovine herpesvirus type 4, strain b11-41, in bovine nervous tissues. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, p.87-93, 2003.

ASBIA. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2013.pdf>. Acesso dia 27 de julho de 2014.

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

AUGSBURGER, H.R.; METZLER, A.E. In vitro growth characteristics of Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) as revealed by indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies and polyvalent antisera. **Arch. Virol.**, v. 104, p. 309-321, 1989.

BAINES, J.D. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. **Trends Microbiol.**, v.19, p.606-613, 2011.

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

BELAK, S.; PALFI, V. Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated bovine kidney cell culture. **Acta Vet. Acad. Sci.**

Hung., v.24, p.249-253, 1974.

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

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

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

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, M.T.; FIRPO, R.; STREL CZUK, G.; FONTOURA, F.E.; KULMANN, M.I.; MAIDANA, S.; ROMERA, S.A.; SPILKI, F.R.; SILVA, A.D.; HÜBNER, S.O.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.171, p.182-188, 2014.

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

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

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

CAVIRANI, S.; ALLEGRI, G.; FLAMMINI, C.F. Tipizzazione sierologica di stipiti di Bovid herpesvirus-4 (BHV-4) isolate in corso di glossite ulcerativa cronica della bovina da latte e comportamento dell'infezione sperimentale. **Selezione Veterinaria**, v. 31, p. 1261-1269, 1990.

COSTA, G. A.; VASCONCELOS, A. C.; BOMFIM, M. R. A.; AMORIM, H. B.; LIMA, G. B. L.; COELHO, F. M.; RESENDE, M. Neurological disorder in cattle

associated with Bovine herpesvirus-4. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 4, p 828-835, 2011.

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

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

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

DEIM, Z.; SZEREDI, L.; TOMPÓ, V.; EGYED, L. Detection of bovine herpesvirus 4 in aborted bovine placentas. **Microb. Pathog.**, v.41, p.144-148, 2006.

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

DIALLO I.S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v.175, p.46– 52, 2011.

DIALLO, I.S.; HEWITSON, G.R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Aust. Vet. J.**, v.88, p.93-95, 2010.

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

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

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

DONOFRIO, G.; RAVANETTI, L.; CAVIRANI, S.; HERATH, S.; CAPOCEFALO, A.; SHELDON, I.M. Bacterial Infection of endometrial stromal cells influences

bovine herpesvirus 4 immediate early gene activation: a new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. **Reproduction**, v.136, p.361-366, 2008.

DUBUISSON, J.; BOULANGER, D.; BUBLLOT, M.; THIRY, E.; PASTORET, P.P: Proteins specified by bovine herpesvirus type 4: structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.1743–1753, 1989a,.

DUBUISSON, J.; THIRY, E.; BUBLLOT, M.; THOMAS, I.; VAN BRESSEM, M.F.; COIGNOIL, F.; PASTORET, P.P. Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus 4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. **Vet. Microbiol.**, v.21, p.97-114, 1989b.

EGYED, L. Replication of Bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2109-2111, 1998.

EGYED, L.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BARTHA, A.; BELÁK, S. Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.1091-1095, 1996.

EGYED, L.; BARTHA, A. PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. **Vet. Res. Commun.**, v.22, p.209-216, 1998.

EGYED, L.; KLUGE, J.P.; BARTHA, A. Histological studies of bovine herpesvirus type 4 infection in non-ruminant species. **Vet. Microbiol.**, v.57, p.283–289, 1997.

EGYED, L.; SASSI, G.; TIBOLD, J.; MÁDL, I.; SZENCI, O. Symptomless intrauterine transmission of Bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. **Microb. Pathog.**, v. 50, p. 322-325, 2011.

EHLERS, B.; BUHK, H.J.; LUDWIG, H. Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyreplicative DNA unit, and comparison of European and American strains. **J. Gen. Virol.**, v.66, p.55-68, 1985.

EUGSTER, A.K. Isolation of bovine herpesvirus III from diarrheic feces. **Vet. Microbiol.**, v.3, p.199-204, 1979.

EVERMANN, J.F; MUELLER, G.M.; DILBECK, P.M. Clinical and diagnostic implications of bovid herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus) infections. **Am. Assoc. vet Lab. Diag. Proc.**, v.27, p.125-136, 1985.

FRANCESCHI, V.; CAPOCEFALO, A.; SANDRO CAVIRANI, S.; DONOFRIO, G. Bovine herpesvirus 4 glycoprotein B is indispensable for lytic replication and irreplaceable by VSVg. **BMC Vet. Res.**, published online, doi: 10.1186/1746-6148-9-6, 2013.

FRANCO, A.C; ROEHE, P.M. Herpesviridae. Em **Virologia Veterinária**, 1ª ed., Brasil, v.2, 2007.

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

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

GILLET, L.; MINNER, F.; DETRY, B.; FARNIR, F.; WILLEM, L.; LAMBOT, M.; THIRY, E.; PASTORET, P.P.; SHYNTS, F.; VANDERSPLASSEHEN, A. Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **J. Virol.**, v.78, p.2336–2347, 2004.

GENBANK. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 25 de junho de 2014.

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

GOLTZ, M.; BROLL, H.; MANKERTZ, A.; WEIGELT, W.; LUDWIG, H.; BUHK, H.J.; BORCHERS, K. Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. **Virus Genes**, v.9, p.53–59, 1994.

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

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

Electrophoresis, v. 21, p. 2522-2530, 2000.

GUO, W.Z.; SHEN, D.T.; EVERMANN, J.F.; GORHAM, J.R. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a complement-fixation test for the detection of IgG to bovine herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus). **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 667-670, 1988.

GUO, H.; SHEN, S.; WANG, L.; DENG, H. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. **Protein Cell**, v.1, p.987-998, 2010.

GÜR, S.; DOGAN, N. The possible role of Bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. **Anim. Sci .J.**, v. 81, p. 304-308, 2010.

HELDWEIN, E.E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cell Mol. Life Sci.**, v.65, p.1653-1668, 2008.

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

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf. Acesso em 27 de julho de 2014.

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

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R.; KIRKLAND, P.D. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes and in vitro culture of presumptive zygotes in the presence of bovine pestivirus. **Anim. Reprod. Sci.**, v.71, p.169–179, 2002.

KÁLMÁN, D., JÁNOSI, S., EGYED, L. Role of Bovine herpesvirus 4 in bacterial bovine mastitis. **Microb Pathog.**, v. 37, p. 125-129, 2004.

KAMINJOLO, J.S.; MUGERA, G.M.; ROSTED ,A.F. Isolation of a herpes-type virus from some tumours of bovine origin. **Zentralbl. Veterinarmed. [B]**, v. 19, p. 626-632, 1972.

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

KRÜGER, E.R. **Herpesvírus bovino 4 (BoHV-4): isolamento e**

caracterização; desenvolvimento de elisa indireto para diagnóstico.
Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2012. 87f. Tese de doutorado - Programa de Doutorado em Processos Biotecnológicos, UFPR, Curitiba.

LADELFA, M.F.; DEL MÉDICO ZAJAC, M.P; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. Comparative study on the *in vitro* and *in vivo* properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. **Acta Vet. Scand.**, v.53, p.37, 2011.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, p.2947-2948, 2007.

LÉTÉ, C.; PALMEIRA, L.; LEROY, B.; MAST, M.; MACHIELS, B.; WATTIEZ, R.; VANDERPLASSCHEN, A.; GILLETA, L. Proteomic characterization of bovine herpesvirus 4 extracellular virions. **J. Virol.**, v.86, p.11567-11580, 2012.

LIANG, X.; PYNE, C.; LI, Y.; BABIUK, L.A.; KOWALSKI, J. Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. **Virology**, v.207, p.429-441, 1995.

LOMONTE, P.; FILEE, P.; LYAKU, J.R.; BUBLLOT, M.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Glycoprotein B of bovine herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and murine gammaherpesvirus 68. **J. Virol.**, v.71, p.3332-3335, 1997.

LUINI, M.; FABBI, M.; CERVIO, G. Isolamento di un herpesvirus da lesioni erosive linguali del bovino. **Estratto sel.Vet.**, v. 26, p. 1131-1133, 1985.

MARLEY, M.S; GIVENS, M.D.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; STRINGFELLOW, D.A. Development of a duplex quantitative polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in bovine follicular fluid. **Theriogenology**, v.70, p.153-160, 2008.

MELANCON, J.M.; FOSTER, T.P.; KOUSOULAS, K.G. genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL 20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. **J. Virol.**, v.78, p.7329-7343, 2004.

METTENLEITER, T.C. Herpesvirus assembly and egress. **J. Virol.**, v.76, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a

tale of two membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.9, p.423-429, 2006.

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

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

MOHANTY, S.B.; HAMMOND, R.C. LILLIE, M.G. A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. **Arch. Gesamt. Virusforsch.**, v. 34, p.394-395, 1971.

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

MORÁN, P.E.; FAVIER, P.A; LOMÓNACO, M.; CATENA, M.C.; CHIAPPARRONE, M.L.; ODEÓN, A.C.; VERNA, A.E.; PÉREZ, S.E. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. **Open Vet. J.**, v.3, p.126-130, 2013.

MORENO-LOPEZ, J.; GOLTZ, M.; REHBINDER, C.; VALSALA, K.V.; LUDWIG, H. A bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. **Zentbl. Vetmed. B**, v.36, p.481-486, 1989.

NAEEM, K.; MURTAUGH, M.P.; GOYAL, S.M. Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits, and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. **Arch. Virol.**, v.119, p.239-255, 1991.

NIKOLIN, V.M.; DONOFRIO, G.; MILOSEVIC, B.; TADDEI, S.; RADOSAVLJEVIC, V.; MILICEVIC, V. First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. **New Microbiol.**, v.30, p.53-57, 2007.

NIKOLIN, V.; MILICEVIC, V.; RADOSAVLJEVIC, V. Presence of bovine herpesvirus type 4 (bHV-4) infection in bulls for artificial insemination in Serbia. **Acta Vet. (Beogr)**, v.58, p.267-273, 2008.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIASA, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls.

Theriogenology, v.75, p.1139-1145, 2011.

OSORIO, F.A.; REED, D.E.; ROCK, D.L. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. **Vet. Microbiol.**, v.7, p.503-513, 1982.

PARKS, J.B., KENDRICK, J.W. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. **Arch. Gesamte Virusforsch.**, v. 41, p. 211-215, 1973.

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

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

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

ROSSITER, P.B.; GUMM, I.D.; STAGG, D.A.; CONRAD, P.A.; MUKOLWE, S.; DAVIES, F.G.; WHITE, H. Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Res. Vet. Sci.**, v.46, p.337-343, 1989.

RWEYEMAMU, M.M.; LORETU, K. Isolation of "non-syncytia forming" herpesviruses from cattle in Tanzania. **J. Comp. Pathol.**, v. 83, p. 377-386, 1973.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SMITS, C.B.; VAN MAANEN, C.; GLAS, R.D.; DE GEE, A.L.W.; DIJKSTRAB, T.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. **J. Virol. Methods**, v.85, p.65-73, 2000.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. **Theriogenology**, v.53, p.85-94, 2000.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.;

KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.2731-2739, 2011.

THEODORIDIS, A. Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 45, p. 187-195, 1978.

THIBIER, M. A contrasted year for the world activity of the animal transfer industry: a report from the IETS data retrieval committee. **Int. Emb. Transf. Soc. Newsletter**, v.20, n.4, p.13-19, 2002.

THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. **Data Retrieval Committee Annual Report**, United States, 2006. Disponible em: www.iets.org/pdf/data_retrieval/december2006.pdf

THIRY, E.; DUBUISSON, J.; BUBLLOT, M.; VAN BRESSEM, M.F.; PASTORET, P.P. The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v.97, p.72–77, 1990.

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

TODD, W.J.; STORZ, J. Morphogenesis of a cytomegalovirus from an American bison affected with malignant catarrhal fever. **J. Gen. Virol.**, v.64, p.1025–1030, 1983.

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

VANDERPLASSCHEN, A.; BUBLLOT, M.; DUBUISSON, J.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. **Virology**, v.196, p.232-240, 1993.

VANDERPLASSCHEN, A.; GOLTZ, M.; LYAKU, J.; BENARAFI, C.; BUHK, H.J.; THIRY, E.; PASTORET, P.P. The replication *in vitro* of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is restricted by its dna synthesis dependence on the S phase of the cell cycle. **Virology**, v.213, p.328-340, 1995.

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

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

VAN OPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G.; OOMS, L.A.; DEGRYSE, A.D. BHV4 (bovine herpes virus 4) related disorders in Belgian cattle: a study of two problem herds. **Vet. Res. Commun.**, v.12, p.347-353, 1988.

VAN OPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G.; OUDEWATER, J. Toevallige isolatie van het boviene herpesvirus 4 uit de long van een schaap. **Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.**, v.55, p.432-433, 1986.

VERNA, A.E.; MANRIQUE, J.M.; PÉREZ, S.E.; LEUNDA, M.R.; PEREYRA, S.B.; JONES, L.R.; ODEÓN, A.C. Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: high genetic variability and novel phylogenetic groups. **Vet. Microbiol.**, v.160, p.1-8, 2012.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v.22, p.55-65, 2012.

WELLEMANS, G; VAN OPDENBOSCH, E. Association entre l'infection par le BHV-4 et l'avortement chez la vache. **Ann. Méd. Vét.**, v. 133, p. 347-350, 1989.

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

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

WELLENBERG, G.J.; VERSTRATEN, E.R.A.M.; BELAK, S.; VERSCHUREN, S.B.E.; RIJSEWIJK, F.A.M.; PESHEV, R.; VAN OIRSCHOT, J.T. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. **J. Virol. Methods**, v.97, p.101-112, 2001.

YAMAMOTO, Y.; MURAKAMI, K.; INOSHIMA, Y.; NAKANE T.; SAIKA, K.;

SENTSUI, H. Characterization of a bovine herpesvirus type 4 isolated from the spinal cord of a cow with astasia. **Arch. Virol.**, v.145, p.2363- 2370, 2000.

ZIMMERMANN, W.; BROL,L H.; EHLERS, B.; BUHK, H.J.; ROSENTHAL, A.; GOLTZ, M. Genome sequence of Bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. **J. Virol.**, v. 75, p. 1186-1194, 2001.

8. ANEXOS

8.1 - Artigo submetido para a revista *Archivos de Medicina Veterinaria*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Molecular detection of bovine herpesvirus 4 in follicular fluids and semen from Brazilian cattle

Detección molecular del herpesvirus bovino tipo 4 en líquido folicular y semen de bovinos brasileños

F Finoketti^{1*}, F S Campos¹, N R M Albuquerque¹, R M Firpo¹, W M E D Brito², P M Roehle^{1, 3}, A C Franco¹

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. **Sarmiento Leite 500**, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG), Rua 235 s/n, Goiânia, CEP 74605-05, Goiás, Brasil.

³FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Corresponding author: Finoketti, F., Virology Laboratory, **Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences**, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. **Sarmiento Leite 500**, room 208, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655, Fax +55 51 3308 3788, E-mail: fernando_finoketti@yahoo.com.br

Proofs should be sent to: Finoketti, F., Virology Laboratory, **Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences**, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. **Sarmiento Leite 500**, room 208, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655, Fax +55 51 3308 3788, E-mail: fernando_finoketti@yahoo.com.br

33 ABSTRACT

34 Bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4), a member of the *Gammaherpesvirinae* subfamily of
35 the family *Herpesviridae*, has been detected in cattle in all continents. BoHV-4 may be detected in
36 healthy animals, however, it is suggested that this virus is associated to several disorders of the
37 reproductive tract of bovines, and the virus or its genome has been found in clinical and biological
38 samples like fetuses, semen and cells of the granulosa. Given the lack of evidences on the
39 circulation of BoHV-4 in bovines of Brazil, specifically from samples from the reproductive tract,
40 this study aimed the detection of BoHV-4 DNA from semen and follicular fluids of bovines. One
41 hundred and nineteen follicular fluid samples obtained from a slaughterhouse and 164 semen
42 samples obtained in artificial insemination centers were subjected to a nested PCR for the detection
43 of BoHV-4 DNA. BoHV-4 DNA was detected in 2/119 (1.68%) samples from follicular fluid and
44 14/164 (8.54%) of semen samples. Seven products were subjected to sequencing, confirming the
45 identity of the PCR products. It is the first report on the detection of BoHV-4 DNA in bovine
46 follicular fluid samples and first report on the detection of BoHV-4 DNA in semen in Brazil, which
47 may suggest that the virus may be disseminating in Brazilian cattle through reproductive practices.
48 In addition, the results found here showed the requirement for the testing of such samples, in search
49 for BoHV-4 DNA, in order to prevent the spread of BoHV-4 between the cattle herds and the
50 potential economic losses associated.

51

52 Keywords: bovine herpesvirus 4; follicular fluid; semen; nested PCR

53 INTRODUCTION

54 Bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) is a *Gammaherpesvirus* and belongs to the family
55 *Hepesviridae* (Davison et al 2009). It is an enveloped virus and contains a double-stranded linear
56 DNA genome (Zimmermann et al 2001). It was first isolated in Europe from cattle with respiratory
57 and ocular diseases (Bartha et al 1966) and has been subsequently detected in bovines in all
58 continents (Belak y Palfi 1974, Goyal y Naeem 1992, Egyed et al 1996, Izumi et al 2006, Campos
59 et al, 2014).

60 BoHV-4 is able to infect multiple hosts including bovines (*Bos indicus*), bisons (*Bison*
61 *bison*), buffalos (*Sincerus caffer*) and sheep (*Ovis aries*) (Todd y Storz 1983, van Opdenbosch et al
62 1986, Moreno-Lopez et al 1989, Rossiter et al 1989). This capacity to infect different hosts is
63 reflected *in vitro* by an ability to infect a wide range of cell types, including primary cells and cell
64 lineages of different species, including humans (Egyed 1998, Gillet et al 2004).

65 The pathogenesis of BoHV-4 infections is not yet totally clear. Following the contact with
66 contaminated secretions, a susceptible animal is infected through direct contact (aerosol) and the
67 virus is then able to productively infect cells of the lymphoid organs, the upper respiratory tract, and
68 the urogenital and alimentary tracts (Egyed et al 1996). A latent infection develops in cells of the
69 monocytic lineage, and afterwards the virus can spread to different tissues, reaching the
70 reproductive tract (Donofrio et al 2007). In fact, has been associated with the development of
71 postpartum metritis (Parks y Kendrick 1973, Donofrio et al 2007, Egyed et al 2011), mastitis
72 (Wellenberg et al 2000, Izumi et al 2006) and aborted fetuses (Deim et al 2007). These reports
73 indicate that the virus may be implicated in reproductive disorders of cattle; however, definitive
74 data on its role as a primary agent of diseases in cattle has not yet been presented.

75 Recently, the virus has been isolated from semen samples used in artificial insemination in
76 cattle, suggesting that BoHV-4 can be transmitted sexually in the population (Morán et al 2013).
77 However, its detection in other tissues or fluids of the reproductive tract of bovines was not yet
78 demonstrated.

79 This study was designed to achieve a better knowledge on the presence of BoHV-4 in
80 biological samples of bovines used in techniques applied to artificial insemination (semen) and *in*
81 *vitro* production of embryos (follicular fluid).

82

83 MATERIALS AND METHODS

84 Samples

85 One hundred and nineteen pairs of ovaries from cows were collected in a slaughterhouse
86 located in the central region of Rio Grande do Sul. The animals originated from different farms.
87 Follicular fluids (FF) of each cow were aspirated and pooled in a final volume of 1-1.5 mL per
88 animal. The samples were collected and provided by the staff of the Laboratory of Biotechnology
89 and Animal Reproduction, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul. Aliquots were
90 maintained as a mixture of cells and FF, and stored at -70 °C until processing.

91 One hundred and sixty-four semen samples were obtained. From these, 63 samples were
92 collected in artificial insemination centers in the state of Rio Grande do Sul and 101 samples
93 animals were obtained from bulls from Goiás, Brazil. These samples were stored at -70 °C until
94 processing.

95 Nucleic acids extraction

96 The extraction of DNA from FF was performed with phenol following protocol of
97 Sambrook and Russell (2001), with modifications. One hundred microliters of FF were mixed with
98 a lysis buffer solution containing 800 µL TE⁵N 2x [Tris 20 mM, pH 7.5 (Invitrogen); EDTA 10 mM
99 (Invitrogen); NaCl 5 M (Nuclear)], 200 µL SDS 10 % (Promega) and 3 µL Proteinase K (20
100 mg/mL, USB Corporation), and incubated at 37 °C for 1 h. Thereafter, the material was centrifuged
101 for 10 min at 8765 x g. Four hundred µL of the supernatant was transferred to a new tube to which
102 300 µL of buffered phenol (pH 8.0, Invitrogen) and 15 µL of NaCl (5M, Nuclear) were added. After
103 stirring for 30 min at room temperature, the material was centrifuged for 15 min at 8765 x g. The
104 supernatant was collected and it was added 2.5 x volume absolute ethanol (Synth) and incubated at
105 20 °C for 30 min. Further centrifugation for 15 min at 8765 x g was carried out, forming a DNA
106 pellet, which was resuspended in 30 µL TE [Tris 10 mM, pH 7.5 (Invitrogen); EDTA 1 mM
107 (Invitrogen)]. Finally, 5 µL of RNase (Fermentas) were added and the material was incubated at 37
108 °C for 30 min. Extracted DNA was stored at -20 °C.

109 The extraction of DNA from semen was performed according to van Engelenburg et al
110 (1993) and Smits et al (2000) with modifications. Microtubes containing 50 µL of semen were
111 centrifuged at 8500 x g for 10 minutes. Was added 150 µL of TE and 27.5 µL of lysis solution
112 containing 22 µL of SDS 10% (Promega), 5 µL of Proteinase K (20 mg/mL, USB Corporation) and
113 0.5 µL of carrier RNA (10.3 mg/mL, Sigma). After incubation at 56 °C for 1 hour, were added 220
114 µL of phenol buffered (pH 8.0, Invitrogen) and 27 µL of NaCl (5M, Nuclear). After stirring for 30
115 min at 37 °C, the material was centrifuged for 12 min 8500 x g. The supernatant was collected and
116 were added 0.6 x volumes of absolute isopropanol (Dinâmica). After incubation at -20 °C for 30
117 min, the samples were centrifuged for 20 min at 8500 x g. The isopropanol was discarded and the

118 pellet was resuspended in 100 mL TE. One mL of n-butanol (Vetec) was added to the mixture and
119 the suspension was centrifuged for 10 min at 8500 x g. The supernatant was discarded and the pellet
120 was resuspended in 50 µL of TE. Finally, 5 µL of RNase (Fermentas) were added and the material
121 was incubated at 37 °C for 30 min. Extracted DNA was stored at -20 °C.

122 Polymerase chain reaction

123 The PCR and nPCR followed the protocol of Campos et al. (2014). The first PCR was
124 performed with the following primers: PF 5' CCCTTCTTTACCACCACCTACA 3' and PR 5'
125 TGCCATAGCAGAGAAACAATGA 3', which anneal to conserved regions of the glycoprotein B
126 (gB) gene, giving rise to a product of 615 bp (Wellenberg et al 2001). For each reaction, 25
127 molecules of internal control (IC) were added to avoid false-negative reactions. The IC is smaller
128 (322 bp) compared to the expected amplicon (Campos et al 2014). The nPCRs were performed with
129 primers PF 5' - CAACAACATCAACAAGCAAGC -3' and PR 5' - GACCACCCTCTGTAAACTG
130 -3', originated a 364 bp product (Campos et al 2014). The sensitivity of detection is 2.5 to 25
131 molecules of viral DNA and the amplification conditions were set as previously described by
132 Campos et al (2014). The products were visualized in electrophoresis agarose gel (Invitrogen) 1.5%,
133 stained with ethidium bromide (0.5 mg / ml, Promega).

134 To avoid contamination with PCR products, certain measures were adopted: isolated rooms
135 were used for PCR and nPCR mix preparation, preparation of the PCR and nPCR reactions, DNA
136 extraction and analysis of PCR products; filter tips were used in all procedures; the laminar flows
137 used for preparation of mix and reactions were decontaminated with UV light and workbenches
138 with ethanol; negative controls were included in every ten PCR reactions.

139 Sequencing and phylogenetic analysis

140 Nested PCR products were cloned into pCR 2.1 vector (TOPO® TA Cloning® kit,
141 Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Vectors with inserts were submitted to
142 sequencing in DYEnamic ET terminators sequencing kit (GE Healthcare, Giles, United Kingdom)
143 to confirm the identity of amplicons. The nucleotide sequences were determined by using an
144 automatic sequencer MegaBACE 500 (GE Healthcare). Each product was sequenced 2 times in
145 both directions using the primers described earlier. The sequences obtained were analyzed using the
146 softwares BioEdit package 7.0.5, Vector NTI 8.0, and Sequence Scanner Version 1.10 (Copyright
147 Applied Biosystems, 2005). Subsequently, the analysis of the homology of the sequences was
148 performed using BLAST software and alignments were performed using the Clustal W software,
149 version 2.0 using the default parameters (Larkin et al 2007). Phylogenetic analyses were performed

150 with the MEGA 5 software (Tamura et al 2011). The evolutionary history is implied through the
151 method of Maximum Likelihood using 1000 bootstraps.

152

153 RESULTS

154 BoHV-4 DNA was detected in 2/119 (1.68%) samples of FF. From 164 semen samples, 14
155 (8.54%) were positive for BoHV-4 DNA. Two of those originated from artificial insemination
156 centers in the state of Rio Grande do Sul, while 12 originated from bulls from Goiás. The
157 sequencing confirmed that the amplicons obtained correspond to BoHV-4 DNA. The phylogenetic
158 tree confirmed that the samples obtained in this study are similar to BoHV-4 sequences available in
159 GenBank (Figure 1), and the region amplified by this reaction is conserved among all the samples
160 of BoHV-4.

161

162 DISCUSSION

163 BoHV-4 is a widespread virus that is supposed to be involved with reproductive disorders in
164 cattle. The aim of this study was to demonstrate the presence of BoHV-4 DNA in semen and FF
165 samples collected from bovines, in an attempt to achieve a better knowledge about its distribution in
166 cells and tissues of bovines and about its pathogenesis.

167 Following the application of a previously optimized nPCR, virus DNA was detected at low
168 percentages (1.68% in FF and 8.54% in semen samples). It is the first report on the detection of
169 DNA of BoHV-4 in follicular fluid samples, and this finding may suggest a new route of
170 transmission of this virus. Once the ovaries used in artificial breeding of cattle can be obtained from
171 animals with unknown health status, this agent may be being transmitted through breeding cattle
172 biotechniques. However, only the detection of the viral genome does not mean that the virus is
173 present as infectious viral particles. Other viruses, such as *Bovine viral diarrhea virus*, have been
174 also found in FF and may represent a risk of economic losses when it infects the embryos, leading
175 to a reduction of the embryo fertilization, maturation and development rates (Stringfellow y Givens
176 2000, Kafi et al 2010). Thus, future studies are needed to clarify if the virus is present as infectious
177 particles in FF, if transmission of BoHV-4 through ovaries and oviducts used in the *in vitro*
178 embryos production is possible and if the virus is able to cause reproductive losses following the
179 infection of bovine embryos.

180 BoHV-4 DNA was detected in semen collected in cattle farms and in artificial insemination
181 centers. However, in semen obtained from artificial insemination centers the frequency of positive
182 samples was lower (2/63; 3.2 %) than in semen collected in farms (12/101; 11.9 %). This difference

183 may be due to a higher quality of sanitary practices applied to animals used in insemination centers.
184 The presence of BoHV-4 DNA in semen reinforces the findings of previous studies. In Serbia,
185 semen samples collected from 18 BoHV4-seropositive bulls were submitted to a nPCR for the
186 detection of BoHV-4 DNA. Only one of these samples was DNA positive (Nikolin et al 2008). In
187 the same study, virus isolation was performed, but the authors were unable to isolate the virus. In
188 Argentina, 70 semen samples obtained from artificial insemination centers were tested by PCR and
189 nPCR. The DNA of BoHV-4 was detected in 3 (4.3%) samples, only when the nPCR technique was
190 used, demonstrating the importance of using a highly sensitivity technique for BoHV-4 detection in
191 semen (Morán et al 2013). The authors have submitted the positive samples to virus isolation and
192 BoHV-4 was isolated from three samples, suggesting that BoHV-4 can be transmitted sexually or
193 by artificial insemination (Morán et al 2013). It is noteworthy that either infectious particles or viral
194 DNA has been found in bovine semen collected at artificial insemination centers, from apparently
195 healthy animals. Therefore, the aliquots of semen for artificial insemination require better control to
196 prevent the spread of BoHV-4 between the cattle herds and potential economic losses.

197 Seven fragments of the expected size for BoHV-4, from both semen and FF, were subjected
198 to sequencing. Despite the samples were similar to other Brazilian sequences, all displayed a single
199 change at the position 225, which was not found previously. This mutation generates a change of a
200 glutamine by a histidine at position 75 of the protein. Furthermore, the sample named BT 13
201 displayed a mutation described previously in a Brazilian sample (G256, ID: KC895400), leading to
202 an exchange of a valine by an alanine at position 86 of the protein. While these data confirm the
203 presence of BoHV-4 DNA in the sampled animals, the small nucleotide changes observed indicate
204 that, similarly to other members of the family *Herpesviridae*, although the BoHV-4 sequences
205 presented here seem to be conserved in comparison to other Brazilian sequences described
206 previously, small changes may occur.

207 These data contribute to the present knowledge on BoHV-4 distribution in bovines in Brazil.
208 The sperm and FF thus emerge as potential carriers of viral transmission; however BoHV-4 seems
209 to be of limited pathogenic potency. To date, no vaccine targeted against BoHV-4 has become
210 available and the control of infection relies on the detection of virus positive animals. Consequently
211 PCR assays might be the recommended as a test of choice for the screening of semen and FF
212 samples for the presence of BoHV4.

213

214 RESUMEN

215 El herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4) es un herpesvirus miembro de la subfamilia
216 Gammaherpesvirinae, género Rhadinovirus que ha sido detectado en bovinos sanos y con diferentes
217 signos clínicos en todos los continentes. Algunas investigaciones sugieren que este virus está
218 relacionado con diversas enfermedades del tracto reproductor bovino. De este modo, es necesario
219 investigar la presencia del virus en líquido folicular y muestras de semen potencialmente útiles en
220 inseminaciones artificiales, con el objetivo de reducir su transmisión y posibles pérdidas
221 económicas causadas por la infección. Ciento diecinueve líquidos foliculares de hembras
222 sacrificadas en un matadero y 164 muestras de semen congeladas de centros de inseminación
223 artificial se sometieron a una PCR anidada para la detección del genoma de BoHV-4. Se detectó
224 ADN de BoHV-4 en 2 muestras (1,68%) de líquido folicular y en 14 (8,54%) de semen. Siete
225 productos fueron sometidos a secuenciación, que reveló la similitud de estas muestras con muestras
226 europeas. Es el primer reporte de detección de ADN de BoHV-4 en muestras de líquido folicular
227 que puede sugerir una nueva vía de transmisión de este agente. Por lo tanto, las alícuotas de semen
228 para inseminación artificial y los ovarios para producción de embriones *in vitro*, requieren de un
229 mayor control para evitar la propagación de BoHV-4 en los rebaños de ganado y las posibles
230 pérdidas económicas.

231

232 Palabras clave: herpesvirus bovino 4; semen; líquido folicular; nested PCR

233 ACKNOWLEDGEMENTS

234 The author would like to thank the Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction of
235 Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, for the collection of follicular fluid samples.
236 F.S. Campos is a Postdoc student at the UFRGS/Brazil, grantee of FAPERGS and CAPES. P. M.
237 Roehe is a CNPq research fellow. This work was financially supported by CAPES, CNPq,
238 FAPERGS and FINEP.
239

240 REFERENCES

- 241 Ackermann, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. 2006. *Vet Microbiol* 113, 211-222.
- 242 Bartha A, M Juhasz, H Liebermann. 1966. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with
243 respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Acta Vet Acad Sci Hung* 16, 357-358.
- 244 Belak S, V Palfi. 1974. Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated
245 bovine kidney cell culture. *Acta Vet Acad Sci Hung* 24, 249-253.
- 246 Castrucci G, F Frigeri, M Ferrari, V Cilli, V Aldrovendi, L Rampichini, R Gatti. 1987a. A study of
247 the pathogenesis of bovid herpesvirus-4 in calves. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*
248 34, 473-479.
- 249 Castrucci G, F Frigeri, M Ferrari, B PedinI, V Aldrovendi, V Cilli, L Rampichini, R Gatti. 1987b.
250 Reactivation in calves of latent infection by bovid herpesvirus-4. *Microbiologica* 10, 37-45.
- 251 Campos FS, A C Franco, MT Oliveira, R Firpo, G Strelczuk, FE Fontoura, MI Kulmann, S
252 Maidana, SA Romera, FR Spilki, AD Silva, SO Hübner, PM Roehle. 2014. Detection of
253 bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally
254 infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 171, 182-188.
- 255 Davison AJ, R Eberle, B Ehlers, GS Hayward, DJ McGeoch, AC Minson, PE Pellett, B Roizman,
256 MJ Studdert, E Thiry. 2009. The order *Herpesvirales*. *Arch Virol* 154, 171-177.
- 257 Deim Z, L Szeredi, L Egyed. 2007. Detection of bovine herpesvirus-4 DNA in aborted bovine
258 fetuses. *Can J Vet Res* 71, 226-229.
- 259 Donofrio G, S Herath, C Sartori S Cavirani, CF Flammini, IM Sheldon. 2007. Bovine herpesvirus 4
260 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction* 134,
261 183-187.
- 262 Egyed L, A Ballagi-Pordány, A Bartha, S Belák. 1996. Studies of in vivo distribution of bovine
263 herpesvirus type 4 in the natural host. *J Clin Microbiol* 34, 1091-1095.
- 264 Egyed L. 1998. Replication of Bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. *J Clin Microbiol*
265 36, 2109-2111.
- 266 Egyed L, G Sassi, J Tibold, I Mádl, O Szenci. 2011. Symptomless intrauterine transmission of
267 Bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. *Microb Pathog* 50, 322-325.
- 268 Gillet L, F Minner, B DetrY, F Farnir, L Willem, M Lambot, E Thiry, PP Pastoret, F ShyntS, A
269 Vandersplassehen. 2004. Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine
270 herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive
271 persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced
272 apoptosis. *J Virol* 78, 2336-2347.

273 Goyal SM, K Naeem. 1992. Bovine herpesvirus-4: a review. *Vet Bull* 62, 181-201.

274 Homan EJ, BC Easterday. 1981. Further studies of naturally occurring latent bovine herpesvirus
275 infection. *Am J Vet Res* 42, 1811-1813.

276 Izumi Y, S Tsuduku, K Murakami, T Tsuboi, M Konishi, M Haritani, T Kamiyoshi, K Kimura, H
277 Sentsui. 2006. Characterization of bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with
278 mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. *J Vet Med Sci* 68, 189-93.

279 Kafi M, MR Mcgowan, PD Kirkland. 2002. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes
280 and in vitro culture of presumptive zygotes in the presence of bovine pestivirus. *Anim
281 Reprod Sci* 71, 169-179.

282 Krogman LA, JP Mcadaragh. 1982. Recrudescence of bovine herpesvirus-5 in experimentally
283 infected calves. *Am J Vet Res* 43, 336-338.

284 Larkin MA, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA Mcgettigan, H Mcwilliam, F Valentin, IM
285 Wallace, A Wilm, R Lopez, JD Thompson, TJ Gibson, DG Higgins. 2007. Clustal W and
286 Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

287 Morán PE, PA Favier, M Lomónaco, MC Catena, ML Chiapparrone, AC Odeón, AE Verna, SE
288 Pérez. 2013. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen.
289 *Open Vet J* v.3, 126-130.

290 Moreno-Lopez J, M Goltz, C RehbindeR, KV Valsala, H Ludwig. 1989. A bovine herpesvirus
291 (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. *Zentbl Vetmed B* 36, 481-
292 486.

293 Naeem K, MP Murtaugh, SM Goyal. 1991. Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated
294 rabbits, and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Virol*
295 119, 239-255.

296 Nikolin V, V Milicevic, V Radosavljevic. 2008. Presence of bovine herpesvirus type 4 (bhv-4)
297 infection in bulls for artificial insemination in Serbia *Acta Vet (Beogr)* 58, 267-273.

298 Osorio FA, DE Reed, DL Rock. 1982. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4:
299 acute and persistent infection. *Vet Microbiol* 7, 503-513.

300 Parks JB, JW Kendrick. 1973. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a
301 case of bovine metritis. *Arch Gesamte Virusforsch* 41, 211-215.

302 Rossiter PB, ID Gumm, DA Stagg, PA Conrad, S Mukolwe, FG Davies, H White. 1989. Isolation
303 of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Res Vet Sci* 46, 337-343.

304 Sambrook J, DW Russel. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold
305 Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

306 Smits CB, C van Maanen, RD Glas, ALW de Gee, T Dijkstrab, JT van Oirschot, FAM Rijsewijk.
307 2000. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of
308 bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J Virol Methods* 85, 65-73.

309 Stringfellow DA, MD Givens. 2000. Infectious agents in bovine embryo production: harzards and
310 solutions. *Theriogenology* 53, 85-94.

311 Tamura K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei, S Kumar. 2011. MEGA5: molecular
312 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and
313 maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.

314 Todd WJ, J Storz. 1983. Morphogenesis of a cytomegalovirus from an American bison affected
315 with malignant catarrhal fever. *J Gen Virol* 64, 1025–1030.

316 van Engelenburg FA, RK Maes, JT van Oirschot, FAM Rijsewijk. Development of a rapid and
317 sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in
318 bovine semen. *J Clin Microbiol* 31, 3129-3135.

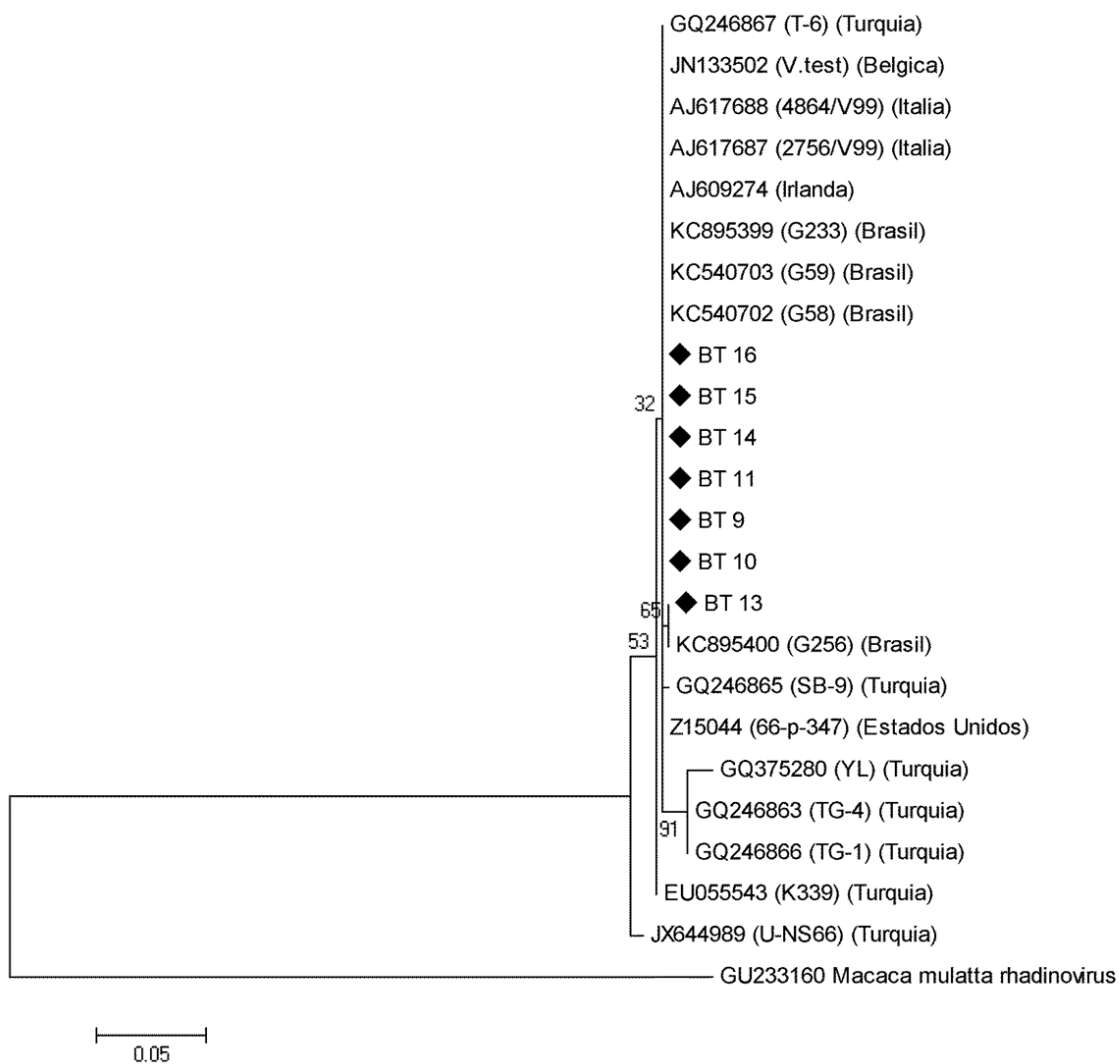
319 van Opdenbosch E, G WellemanS, J Oudewater. 1986. Toevallige isolatie van het boviene
320 herpesvirus 4 uit de long van een schaap. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr* 55, 432–433.

321 Wellenberg GJ, WHM van der Poel, TJK van der Vorst, PHR van Valkengoed, YH Schukken, F
322 Wagenaar, JT Van Oirschot. 2000. Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. *Vet Rec*
323 147, 222-225.

324 Wellenberg GJ, ERAM Verstraten, S Belak, SBE Verschuren, FAM Rijsewijk, R Peshev, JT van
325 Oirschot. 2001. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase
326 DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods* 97, 101-112.

327 Zimmermann W, LH Brol, B Ehlers, HJ Buhk, A Rosenthal, M Goltz. 2001. Genome sequence of
328 Bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA
329 replication. *J Virol* 75, 1186-1194.

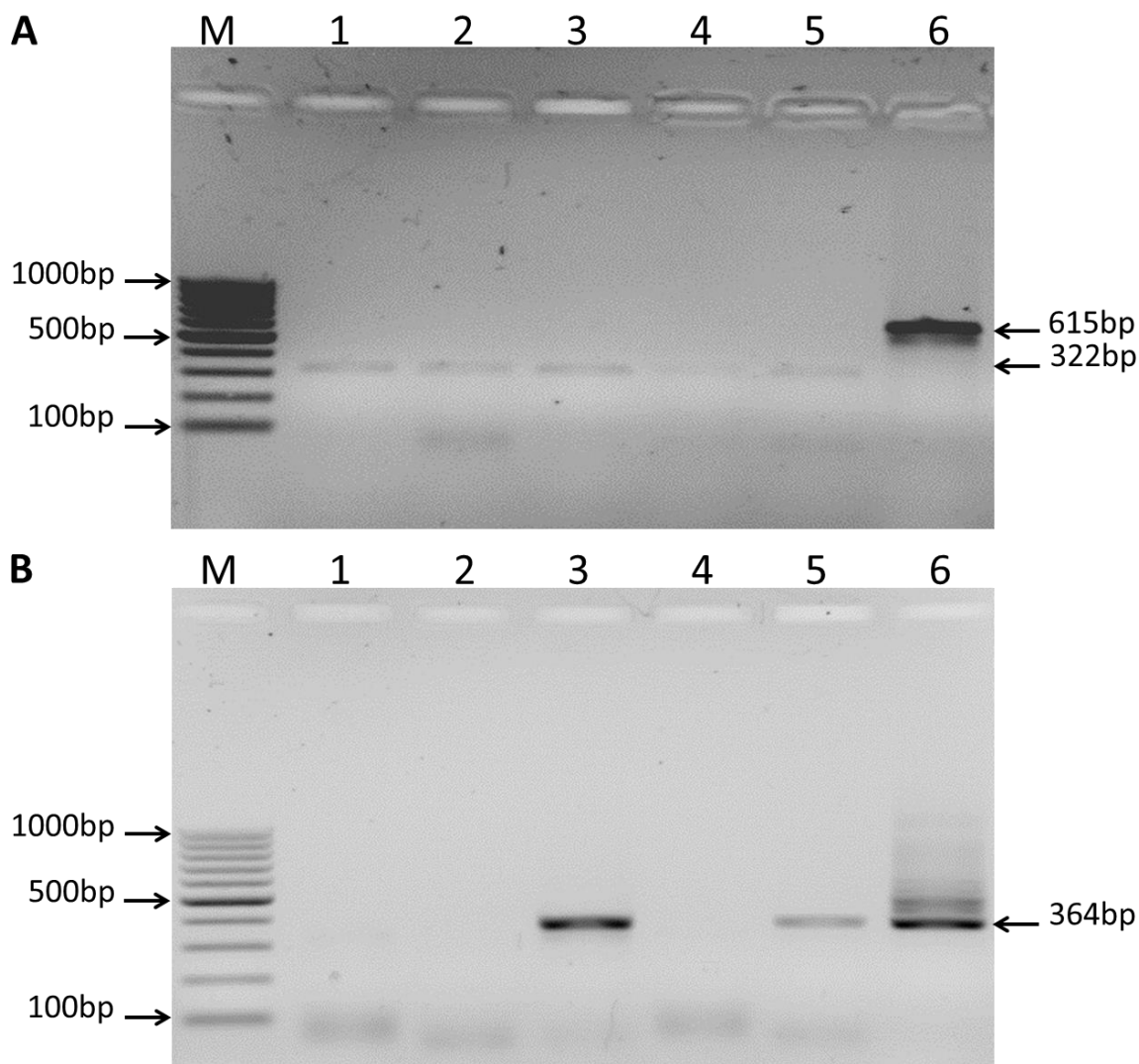
330



331

332 Figure 1 – Phylogenetic tree of BoHV-4. Phylogenetic tree of seven amplicons of BoHV-4 obtained
 333 in this study, discernible with black lozenges (◆), and 16 additional sequences deposited in the
 334 GenBank database. This data showed that the sequences obtained in this study are BoHV-4 DNA.
 335 The *Rhadinovirus* of *Macaca mulatta* was used as the out-group.

336 Figura 1 - El análisis filogenético de BoHV-4. Árbol filogenético de siete amplicones de BoHV-4
 337 obtenidos en este estudio, discernible con rombos negros (◆), y 16 secuencias adicionales
 338 depositados en la base de datos GenBank. Estos datos mostraron que las secuencias obtenidas en
 339 este estudio son ADN de BoHV-4. Se utilizó como grupo externo el *Rhadinovirus* de *Macaca*
 340 *mulatta*.



341

342 Figure 2 – Electrophoresis in 1.5% agarose gel of the PCR products and nPCR. **A.** Analysis of PCR
 343 amplification of BoHV-4. Lane 1 and 2: semen DNA samples. Lane 3 and 4: follicular fluids DNA
 344 samples. Lane 5: negative control. Lane 6: positive control (MOVAR DNA strain grown in MDBK
 345 cells). Lane M is 100 bp DNA Ladder (BioLabs). The size of CI fragment is 322 bp and the target
 346 PCR fragment is 615 bp. **B.** Analysis of nPCR amplification of BoHV-4. Lane 1: negative control
 347 amplified from 1 μ L of sample in lane 5 from figure 1A. Lane 2 and 3: semen DNA samples
 348 amplified from 1 μ L of sample in lane. 1 and 2 from figure 1A respectively. Lane 4 and 5: follicular
 349 fluids DNA samples amplified from 1 μ L of sample in lane.3 and 4 from figure 1A respectively.
 350 Lane 6: positive control amplified from 1 μ L of sample in lane.5 from figure 1A. Lane M is 100 bp
 351 DNA Ladder (BioLabs). The target nPCR fragment is 364 pb.

352 Figura 2 - Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR y nPCR. **A.** Análisis de
 353 amplificación por PCR de BoHV-4. Carril 1 y 2: muestras de ADN de semen. Carril 3 y 4: muestras
 354 de ADN de fluidos foliculares. Carril 5: control negativo. Carril 6: control positivo (ADN de cepa

355 MOVAR crecido en células MDBK). Carril M es 100 bp DNA Ladder (BioLabs). El tamaño del
356 fragmento de CI es 322 pb y el fragmento de PCR objetivo es 615 pb. **B.** Análisis de amplificación
357 por nPCR de BoHV-4. Carril 1: control negativo amplificado a partir de 1 µL de muestra del carril
358 5 de la figura 1A. Carril 2 y 3: muestras de ADN de semen amplificadas a partir de 1 µL de muestra
359 del carril. 1 y 2 de la figura 1A, respectivamente. Carril 4 y 5: muestras de ADN de fluidos
360 foliculares amplificadas a partir de 1 µL de muestra del carril 3 y 4 de la figura 1A,
361 respectivamente. Carril 6: control positivo amplificado a partir de 1 µL de muestra del carril 5 de la
362 figura 1A. Carril M es 100 bp DNA Ladder (BioLabs). El tamaño del fragmento de nPCR objetivo
363 es 364 pb.