

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 INFECÇÕES LATENTES POR HERPESVÍRUS BOVINO 1 E
5 EM GÂGLIOS TRIGÊMEOS DE BOVINOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

FABRÍCIO SOUZA CAMPOS
Médico Veterinário

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2009

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 INFECÇÕES LATENTES POR HERPESVÍRUS
BOVINO 1 E 5 EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS DE BOVINOS ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

FABRÍCIO SOUZA CAMPOS
Médico Veterinário

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
Fevereiro de 2009

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

C198d Campos, Fabrício Souza

Detecção de infecções latentes por herpesvírus bovino 1 e 5 em gânglios trigêmeos de bovinos através da técnica de reação em cadeia da polimerase / Fabrício Souza Campos. – 2009.

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, 2009.

Orientação: Prof^a. Ana Cláudia Franco

1. Herpesvírus bovino 1 2. Herpesvírus bovino 5 3. Infecções por herpesvírus 4. Reação em cadeia da polimerase I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

CDU 578:619(043)

FABRÍCIO SOUZA CAMPOS
MÉDICO VETERINÁRIO
UFPEL

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

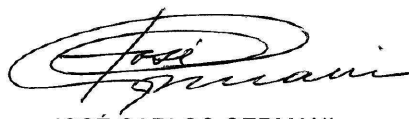
Aprovada em: 27/02/2009
Pela Banca Examinadora


ANA CLÁUDIA FRANCO
Orientadora ICBS-UFRGS



ANA PAULA GUEDES FRAZZON
ICBS -UFRGS


SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER
UFPEL

Homologado em: 14/05/2009
Por:


JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA


FERNANDO ROSADO SPILKI
FEEVALE


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

A memória de minha avó, Amélia Gomes Vieira, 86 anos, matriarca da família Souza Vieira, com seus 15 filhos, 31 netos, 22 bisnetos e 1 trineto.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é um resultado de um grande esforço, não somente de muitas mãos, mas principalmente, de muitas mentes. A todos que estiveram envolvidos neste trabalho, o meu muito obrigado.

Um sincero e especial agradecimento à Profa. Ana Cláudia Franco (Aninha) pela sua dedicação e paciência em me orientar. Também pela amizade, apoio e total confiança em mim depositada.

Ao Dr. Frans Rijsewijk, muitíssimo obrigado pela amizade, apoio, discussões, compreensão, paciência e, além disto, obrigado pelas críticas e observações sempre pertinentes e pelo grande estímulo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Roehe (Patrão) pela confiança profissional e acadêmica em mim depositadas. Por mostrar que quando alguma coisa está boa, ela ainda pode ser melhor.

A vocês três um especial obrigado pelo exemplo de seriedade, entusiasmo e de dedicação à pesquisa.

À Profa. Sílvia de Oliveira Hübner, fundamental no início deste trabalho e em meu ingresso na virologia, obrigado também por aceitar ser parte da banca.

Ao Prof. Fernando Spilki, pelo entusiasmo, amizade, apoio, agilidade nas respostas e auxílio na execução deste trabalho, obrigado por aceitar ser parte da banca.

Aos amigos dos Laboratórios de virologia do IPVDF, ICBS/UFRGS, UFPEL: Ale, Ana Paula, André, Anna Paula, Cenci, Dadá, Dani, Dennis, Dinler, Diógenes, Eber, Eduardo, Esmail, Fábio, F. Torres, Franco, Geferson, Gustavo, Helton, Hiran, Jarbas, Ju, Lucas, Luciana, Manu, Martha, Nathália, Paulinho, Samuel, Thaís pela convivência, auxílio nos momentos importantes e alegrias ao longo da realização deste trabalho.

À minha namorada Tiane, pelo amor, carinho, dedicação e paciência neste momento tão importante em minha vida. E aos seus pais, Eloino e Ivany, pelo apoio.

A todos meus familiares, em especial a minha mãe Ana Maria, meu pai Antônio (Nico) e minhas queridas irmãs: Lê, Bia e Carlinha, que mesmo distante, me deram forças para concluir este trabalho e não mediram esforços para que eu pudesse continuar. Agradeço por todo amor e apoio incondicional.

Aos meus amigos que souberam entender os momentos ausentes, grato pela compreensão e apoio.

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

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

Aos produtores rurais e seus colaboradores, o meu reconhecimento e gratidão.

Ao CNPq pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

DETECÇÃO DE INFECÇÕES LATENTES POR HERPESVÍRUS BOVINO 1 E 5 EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS DE BOVINOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE¹

Autor: Fabrício Souza Campos
Orientadora: Ana Cláudia Franco

RESUMO

Infecções pelos herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) têm sido sistematicamente detectadas em rebanhos bovinos brasileiros. Entretanto, por causa da alta similaridade antigênica entre estes dois vírus e a falta de testes sorológicos específicos, a prevalência de cada um deles é atualmente desconhecida. Com o objetivo de detectar e diferenciar infecções latentes causadas por BoHV-1 e/ou BoHV-5, gânglios trigêmeos de 200 bovinos foram coletados e analisados para a presença de DNA viral. As amostras foram coletadas em um frigorífico localizado no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul. Uma PCR semi quantitativa foi desenvolvida, otimizada e utilizada para detectar o DNA viral em gânglios. Para diferenciar entre infecções por BoHV-1 e BoHV-5, duas nested PCR tipo-específicas foram desenvolvidas e utilizadas. Além disto, as amostras de soros obtidas foram submetidas a testes de neutralização viral (VN) para detecção de anticorpos. O DNA de BoHV-1 e/ou BoHV-5 foi detectado em 87% dos animais. Os resultados das nested PCRs revelaram que 82,8% dos animais positivos estavam latentemente infectados com BoHV-1 e 93,1%, com BoHV-5. Além disto, foi detectada uma alta proporção de animais co-infectados com os dois vírus (75,9 %). Por outro lado, os resultados das VN mostraram que somente 49,5% dos animais apresentaram anticorpos anti-virais. Este é o primeiro estudo que utiliza testes moleculares para detectar infecções latentes por BoHV-1 e/ou BoHV-5 em gânglios de um grande número de animais e mostra uma alta proporção de co-infecções por estes dois vírus em bovinos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118 p.) Fevereiro, 2009.

DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS 1 AND 5 LATENT INFECTIONS IN TRIGEMINAL GANGLIA OF BOVINES BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION²

Author: Fabrício Souza Campos
Supervisor: Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) infections have been consistently detected in Brazilian bovine herds. However, mainly because of their high antigenic similarity and the lack of specific serologic tests for both viruses, the prevalence of each of these viruses is currently unknown. Aiming the detection and differentiation of latent infections caused by BoHV-1 and/or BoHV-5, we collected trigeminal ganglia of 200 bovines and analyzed them for the presence of viral DNA. The samples were collected in an abattoir located in Capão do Leão, Rio Grande do Sul. A semi quantitative PCR was developed, optimized and used to detect the viral DNA in ganglia. To differentiate between BoHV-1 and BoHV-5 infections, two type-specific nested PCR were developed and performed. In addition, for the detection of anti-viral antibodies, serum samples were submitted to the virus neutralizing test (VNT). DNA of BoHV-1 and/or BoHV-5 was detected in 87% of the animals. The results of the nested PCRs revealed that 82.8% of the bovines were latently infected with BoHV-1 and 93.1%, with BoHV-5. Moreover, we detected a high proportion of co-infected animals (75.9 %). On the other hand, the results of the VNT indicated that only 49.5% of the animals had anti-viral antibodies. This is the first study that applies molecular tests to detect latent infection by either BoHV-1 and/or BoHV-5 in ganglia of a high number of animals and shows such a high proportion of co-infections of these two viruses in bovines.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118 p.) February, 2009.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – Objetivos gerais.....	02
1.1 – Objetivos específicos.....	02
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 – Descrição do agente.....	03
2.2 – Genoma.....	04
2.3 – Proteínas virais.....	05
2.3.1 – Glicoproteína G.....	06
2.4 – Ciclo replicativo.....	07
2.4.1 – Adsorção.....	08
2.4.2 – Fusão e penetração.....	08
2.4.3 – Transporte.....	09
2.4.4 – Expressão gênica e replicação do genoma.....	09
2.4.5 – Morfogênese.....	10
2.4.6 – Maturação e egresso.....	11
2.5 – Latência.....	11
2.6 – Subtipos de BoHV-1 e BoHV-5.....	13
2.7 – Patogenia.....	14
2.7.1 – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR).....	15
2.7.2 – Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV).....	16
2.7.3 – Balanopostite pustular infecciosa (IPB).....	16
2.7.4 – Aborto.....	17
2.7.5 – Encefalite.....	17
2.8 – Epidemiologia.....	18
2.9 – Diagnóstico.....	20
2.9.1 – Diagnóstico presuntivo.....	20
2.9.2 – Diagnóstico laboratorial.....	20
2.9.2.1 – Diagnóstico virológico.....	21
2.9.2.2 – Diagnóstico sorológico.....	21
a) Vírus neutralização (VN).....	21
b) Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	22

	Página
2.9.2.3 – Diagnóstico molecular.....	22
a) Análise genômica por restrição enzimática (REA).....	23
b) Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
2.10 – Vacinação e controle.....	24
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 – Células e vírus.....	27
3.2 – Coleta de gânglios trigêmeos.....	27
3.3 – Coleta e processamento das amostras de sangue.....	28
3.4 – Testes de vírus neutralização (VN).....	29
3.5 – Extração de DNA total.....	29
3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase.....	30
3.6.1 – Otimização das condições de amplificação da PCR.....	31
3.6.2 – Construção do controle interno.....	32
3.6.3 – Sensibilidade da PCR.....	33
3.6.4 – Quantificação do DNA de BoHV nos gânglios.....	33
3.6.5 – Detecção de resultados falso-positivos.....	33
3.7 – Nested PCR.....	34
3.7.1 – Otimização das condições de amplificação da nested PCR.....	34
3.8 – Sequenciamento dos produtos.....	35
4 – RESULTADOS.....	37
4.1 – Testes de vírus neutralização.....	37
4.2 – Extração do DNA total de gânglios.....	37
4.3 – Utilização de controle interno na PCR.....	38
4.4 – Sensibilidade da PCR.....	38
4.5 – Determinação do número de cópias do genoma de BoHV nos gânglios trigêmeos.....	40
4.6 – Percentagem de bovinos positivos para a presença de genoma de BoHV em seus gânglios trigêmeos.....	41
4.7 – Resultados da nested PCR para BoHV-1 e BoHV-5 utilizando os produtos da primeira PCR como DNA molde.....	42
4.8 – Sequenciamento dos produtos.....	43
5 – DISCUSSÃO.....	45
6 – CONCLUSÕES.....	54
7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
9 – APÊNDICES.....	75
9.1 – Artigo.....	75
9.1.1 – Resposta dos revisores.....	102
10 – VITA.....	106

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Resultados do teste de vírus neutralização para BoHV-1 e BoHV-5.....	37
TABELA 2	Resultados da PCR para presença de genoma de BoHV por gânglio trigêmeo e por animal.....	42
TABELA 3	Resultados da nested PCR para presença de genoma de BoHV por gânglio trigêmeo e por animal.....	43
TABELA 4	Resultado do sequenciamento dos produtos de nested PCR.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Imagem de microscopia eletrônica do <i>Herpesvírus humano 3</i>	03
FIGURA 2 Organização do genoma de BoHV-1 incluindo as duas sequências únicas, uma longa (UL) e uma curta (US).....	04
FIGURA 3 Ciclo replicativo lítico dos alfa herpesvírus.....	07
FIGURA 4 A – Mapa da América Latina. B – Mapa do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) com os municípios de origem dos animais coletados.....	28
FIGURA 5 Construção de uma sequência de controle interno.....	32
FIGURA 6 Imagem de gel de agarose a 1 % contendo DNA total extraído dos gânglios trigêmeos.....	38
FIGURA 7 Imagem de gel de agarose a 1,5 % demonstrando a co-amplificação de quantidades conhecidas do CI e do DNA viral.....	39
FIGURA 8 Imagem de gel de agarose a 1,5 % demonstrando a co-amplificação de quantidades conhecidas de CI e desconhecida de DNA viral presente em um gânglio positivo para BoHV.....	39
FIGURA 9 Imagem de gel de agarose a 1,5 % demonstrando o resultado da amplificação em amostras de gânglios na presença de 25 moléculas de CI.....	41
FIGURA 10 Imagem demonstrando os produtos da nested PCR e a ocorrência de co-infecções.....	43
FIGURA 11 Alinhamento de sequências de gânglios com sequências disponíveis no GenBank.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMs: anticorpos monoclonais
alfa-TIF: “*trans-inducing factor*”
ATCC: “American Type Cells Collection”
BICPO: “*bovine infected cell protein*”
Blast: “basic local alignment search tool”
BoHV-1: *Herpesvírus bovino tipo 1*
BoHV-5: *Herpesvírus bovino tipo 5*
bp: “base par” ou pares de base
BS: “bootstrap”
CHV: *Herpesvírus canino*
CI: controle interno ou IC (“internal control”)
CO₂: gás carbônico
C-terminal: extremidade carboxi-terminal
DICC₅₀: doses infectantes em 50 % do cultivo celular
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA λ: DNA do bacteriófago lambda
DNA: ácido desoxirribonucléico
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: “enzyme linked immunosorbent assay”
Embrapa CNPSA: Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Concórdia – SC
EMEM: meio mínimo essencial de “Eagle”
EVI: equipe de virologia
Fig.: figura
g: glicoproteína, por exemplo, *gB*: *glicoproteína B*
GC: guanina + citosina
gE: *glicoproteína E* deletada
GenBank: banco de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”)
gene *bLHR*: gene do *receptor do hormônio luteinizante bovino*
gene *ND5*: gene presente no *DNA mitocondrial bovino*
gene *TK*: gene *timidina quinase*
GT: gânglio trigêmeo
HCl: ácido clorídrico
HHV-1: *Herpesvírus humano tipo 1*
HHV-3: *Herpesvírus humano tipo 3*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
ICTVdb: banco de dados do “International Committee of Taxonomy of Viruses”
IF: imunofluorescência
IPB: balanopostite pustular infecciosa
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa
IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IPX: imunoperoxidase
IRs: sequência repetida interna
Kb: kilobases
LB: meio Luria Bertani

LMP: agarose “low melting point”
LTP: “latency-related products”
LTR: “*latency-related transcript*”
M: marcador
MDBK: células renais de bovino “Madin-Darby”
mg: miligrama
MgCl₂: cloreto de magnésio
Min.: minutos
Mix: mistura dos reagentes para o teste de PCR
mL: mililitros
mM: milimolar
n.: número
NEB: “New England Biolabs”
ng: nanogramas
NI: não interpretável
N-terminal: região amino-terminal
°C : graus Celsius
OIE: organização mundial de sanidade animal
p.: página
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase
PF: oligonucleotídeo “forward”
pH: potencial de hidrogênio iônico
PR: oligonucleotídeo “reverse”
%: porcentagem
REA: análise com enzima de restrição
RNA: ácido ribonucleico
RPM: rotações por minuto
SDS: dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
SNC: sistema nervoso central
SuHV-1: *Herpesvírus suíno tipo 1*
Tab.: tabela
TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq polimerase: enzima extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TE: tampão Tris-EDTA
TG: “trigeminal ganglia” ou gânglio trigêmeo
TOPO TA Cloning®: kit de clonagem, Invitrogen
TRs: *sequência repetida terminal*
UFPEl: Universidade Federal de Pelotas
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UL: região *única longa*
US: região *única curta*
UV: luz ultravioleta
µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
v.: volume
VHS: “*virion host shutoff*”
VN ou VNTs: teste de vírus neutralização
VP: “*virion protein*”
VZV: “*Varicella zoster vírus*”
WT: “wild type” ou tipo selvagem

1 – INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil, as infecções causadas pelo Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e pelo Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) não ocasionam altos índices de mortalidade. Entretanto, estes agentes encontram-se amplamente disseminados em muitos rebanhos, afetando clínica e subclínicamente um grande número de animais e, com isto, causando prejuízos econômicos aos criadores de bovinos.

A ampla disseminação destes agentes está relacionada primeiramente e diretamente com o mecanismo de perpetuação destes vírus na espécie bovina - a latência - uma forma de infecção na qual o animal se torna um reservatório do vírus durante toda a sua vida. Além disto, há uma generalizada falta de controle destas viroses no Brasil, o que contribui ainda mais para a sua dispersão. Esta falta de controle está relacionada em certo ponto com a falta de conhecimento sobre a epidemiologia destes agentes. Estes vírus pertencem à mesma família (*Herpesviridae*) e subfamília (*Alphaherpesvirinae*), apresentam uma elevada similaridade molecular, e conseqüentemente, antigênica. Apesar de já terem sido feitos inúmeros estudos sorológicos que revelaram uma alta prevalência destes agentes, devido a reações cruzadas que ocorrem em testes sorológicos é impossível determinar qual dos dois agentes está relacionado à resposta imune detectada.

Conseqüentemente, a prevalência individual de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 continua desconhecida. Através da coleta de gânglios trigêmeos (um reconhecido sítio de latência viral) de animais aparentemente saudáveis destinados ao abate e posterior extração de DNA destas amostras, pretendemos com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) determinar a prevalência de infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 na população estudada. Além disto, através do desenvolvimento de uma PCR semi quantitativa dizer qual a carga viral presente nos gânglios.

1.1 – Objetivos gerais:

- Desenvolver um método molecular de identificação de BoHV-1 e BoHV-5.
- Aplicar a PCR desenvolvida para estimar a prevalência real de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 na população em estudo.
- Com os resultados gerados, aumentar o conhecimento sobre a disseminação destes agentes e auxiliar no controle dos mesmos.

1.2 – Objetivos específicos:

- Padronizar e otimizar uma PCR semi quantitativa para detecção de DNA de BoHV-1 e BoHV-5 em gânglios trigêmeos.
- Utilizar esta PCR para quantificar o número de moléculas de DNA viral presentes nos gânglios.
- Desenvolver duas nested PCR tipo-específicas para determinar qual dos dois vírus está presente nos gânglios.
- Determinar o status sorológico dos animais dos quais foram os gânglios trigêmeos coletados pelo teste de vírus neutralização.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Descrição do agente

Os Herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Os vírions desta família consistem de um envelope, um tegumento e um nucleocapsídeo (capsídeo + genoma) (Fig. 1). São esféricos a pleomórficos, com diâmetro de 120 a 200nm. O tegumento é composto de proteínas organizadas em quantidades variáveis, na forma de uma camada assimétrica localizada entre o envelope e o capsídeo. O capsídeo é redondo e exibe uma simetria icosaédrica (ICTVdb Management, 2006).

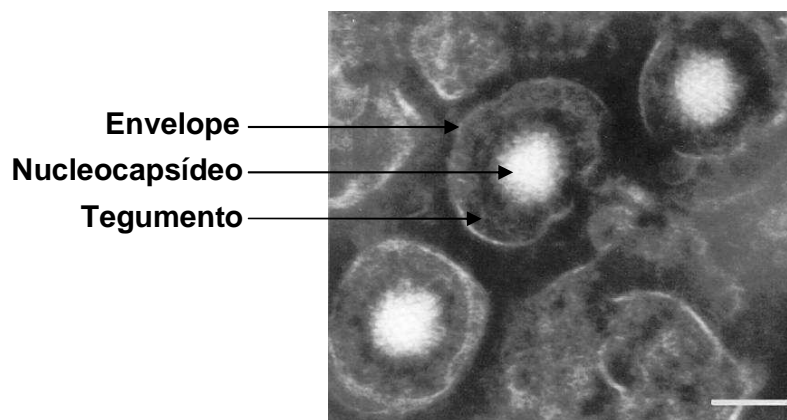


FIGURA 1: Imagem de microscopia eletrônica do *Herpesvírus humano 3* (membro do gênero *Varicellovirus*) por Frank Fenner, John Curtin School, Australian National University. As setas indicam os principais componentes do vírion (envelope, tegumento e nucleocapsídeo). Fonte: ICTVdB - Picture Gallery (<http://phene.cpmc.columbia.edu/Images/Fenner/herpes1.htm>).

2.2 – Genoma

O genoma é não segmentado e contém uma única molécula de DNA dupla fita linear com aproximadamente: 135.870 pares de bases (pb) nucleotídicas (BoHV-1) e 138.390 pb (BoHV-5); sendo em torno de 75% desta composição formada por bases GC (Delhon et al., 2003). É composto de duas sequências únicas: uma única longa ou “long” (UL) e uma única curta ou “short” (US), sendo esta última flanqueada por sequências terminais repetidas inseridas de forma invertida no genoma: a região repetida interna (IR) e a região repetida terminal (TR) (Fig. 2) (Schwyzer & Ackermann, 1996). A replicação do genoma gera quantidades equimolares das duas principais formas do isômero, que difere por uma relativa orientação dos segmentos US.

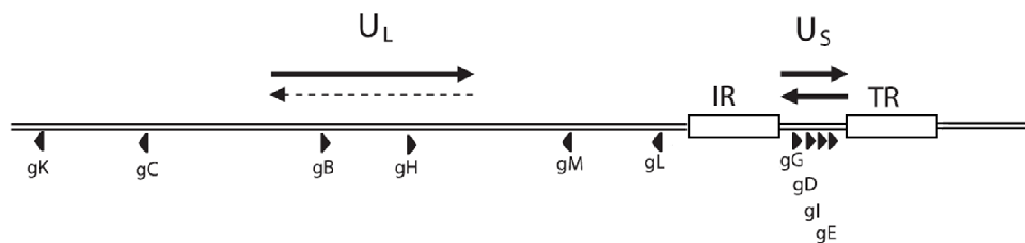


FIGURA 2 – Organização do genoma de BoHV-1 incluindo as duas sequências únicas, uma longa (UL) e uma curta (US). Esta última é flanqueada por duas sequências repetidas e invertidas (uma interna, IR; e outra terminal, TR). A replicação do genoma gera quantidades equimolares das duas principais formas do isômero, que difere por uma relativa orientação dos segmentos US e UL (setas horizontais preenchidas); o segmento UL é predominantemente observado em uma única orientação, mas pode aparecer raramente invertido (seta horizontal tracejada). A localização dos 10 genes que codificam glicoproteínas é indicada pelas cabeças de seta. Adaptado de Muylkens et al. (2007).

No caso do BoHV-1, a sequência compreende 67 genes únicos e dois duplicados, nas repetições internas, codificando 69 proteínas reconhecidas até o momento. A maioria dos genes de BoHV-1 possui sequências homólogas e são denominados de acordo com a nomenclatura existente para o *Herpesvírus humano 1* (HHV-1) (McGeoch et al., 1988).

Devido a semelhanças na morfologia do vírion, efeitos citopáticos em cultivo celular e propriedades antigênicas, o BoHV-5 era considerado como uma variante neurológica de BoHV-1, denominado BoHV-1.3 (Engels et al., 1986; Metzler et al., 1986).

Estudos comparativos baseados no mapeamento do DNA viral por enzimas de restrição, testes de reação imune cruzada e reatividade frente a anticorpos monoclonais demonstraram diferenças genômicas e antigênicas entre ambos os vírus (Metzler et al. 1986; D'Offay et al., 1993; Pidone et al., 1999; D'Arce et al., 2002). Desta forma, a partir de 1992, o BoHV-5 foi reconhecido como um vírus distinto pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Roizman et al., 1992).

O BoHV-5 contém em torno de 70 genes, dos quais, 68 estão presentes como cópias simples dentro das regiões únicas e 2 iniciam e estão completamente localizados dentro das regiões repetidas. Estes genes estão densamente reunidos e sobrepostos em suas fases de leituras, sendo que cada gene é regulado pelo seu próprio promotor (Delhon et al., 2003).

2.3 – Proteínas Virais

O BoHV-1 e BoHV-5 são vírus muito semelhantes, como refletido no nível de identidade, cerca de 82%, em seus aminoácidos (Delhon et al., 2003). Entre as proteínas codificadas por BoHV-1 e BoHV-5, pelo menos nove são glicoproteínas. Algumas são essenciais à replicação viral (gB, gD, gH, gL e gK) e outras (gC, gE, gI, gM), embora desempenhem funções importantes, não são essenciais ao processo de replicação viral (Schwyzer & Ackermann, 1996).

As glicoproteínas atuam em inúmeras etapas do ciclo de replicação viral (reconhecimento e ligação aos receptores celulares; fusão das membranas viral e celular; penetração do material viral no citoplasma; maturação e saída das partículas virais da célula), bem como muitas são importantes em estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro (Hanon et al., 1999; Winkler et al., 1999; Liman et al., 2000; Koppers-Lalic et al., 2001).

2.3.1 – Glicoproteína C (gC)

O gene UL 44, encontrado no genoma do BoHV-1 e do BoHV-5, codifica a gC (Delhon et al., 2003). É uma das principais glicoproteínas virais, sendo expressa em altos níveis no envelope viral e na superfície de células infectadas. Seu papel principal está relacionado à adsorção viral, ligando-se aos receptores de heparina na superfície das células-alvo (Okazaki et al., 1994).

No vírion, a gC apresenta-se como um dímero de 508 aminoácidos (codificada por 1572 nucleotídeos) no BoHV-1 e 486 aminoácidos (codificada por 1464 nucleotídeos) no BoHV-5. As gCs destes vírus compartilham cerca de 75% de similaridade. A região amino-terminal (N-terminal) concentra a maior parte das diferenças entre as gCs de BoHV-1 e BoHV-5, enquanto que as regiões central e carboxi-terminal (C-terminal) apresentam-se bem mais conservadas (Schwyzer & Ackermann, 1996). Estas características fazem da gC um potencial alvo para o desenvolvimento de provas de diagnóstico diferencial entre BoHV-1 e BoHV-5 e esta proteína já foi explorada várias vezes no desenvolvimento de técnicas moleculares do tipo reação em cadeia da

polimerase (PCR) para detecção de BoHV-1 ou diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 (Van Engelenburg et al., 1993; Ashbaugh et al., 1997; Ros et al., 1999; Claus et al., 2005; Esteves et al., 2008).

2.4 – Ciclo replicativo

Os vírus da família *Herpesviridae* replicam o seu genoma no núcleo da célula hospedeira utilizando fatores virais e celulares. O processo de replicação viral de BoHV-1 e BoHV-5 em células permissivas (Fig. 3) tem como modelo o ciclo de replicação do HHV-1 (protótipo da família).

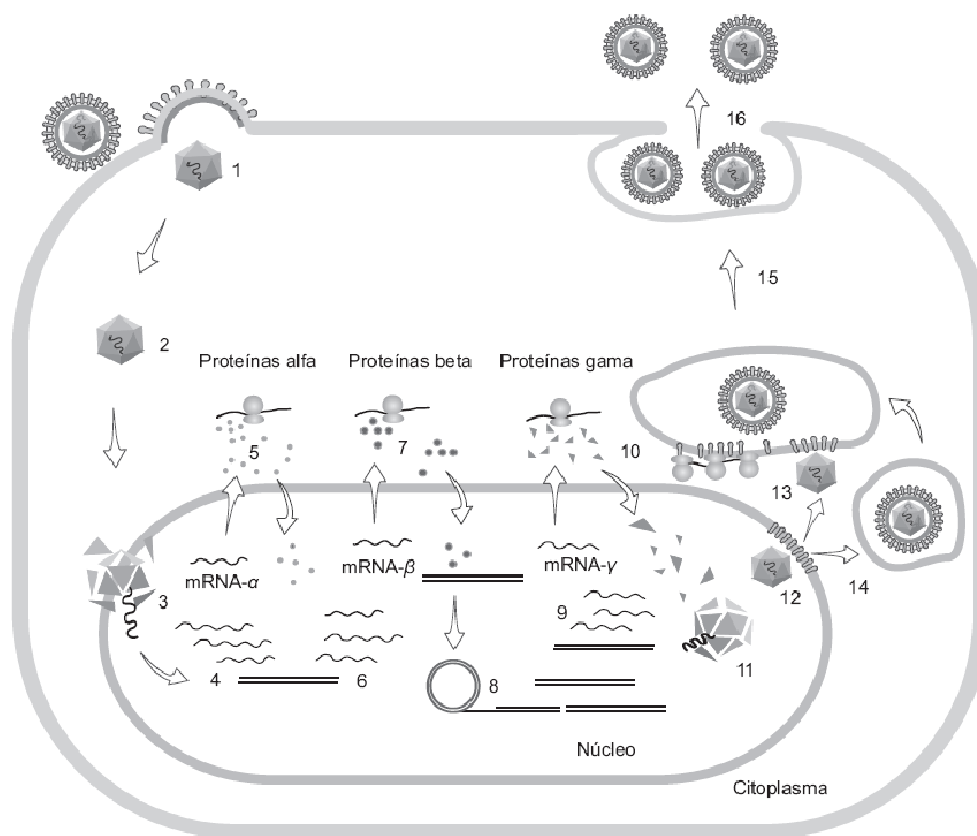


FIGURA 3 - Ciclo replicativo lítico dos alfa herpesvírus: (1) Penetração por fusão do envelope com a membrana plasmática. (2) Transporte do nucleocapsídeo até os poros nucleares. (3) Desnudamento e liberação do genoma no interior do núcleo. (4) Transcrição dos genes alfa. (5) Tradução das proteínas alfa. (6) Transcrição dos genes beta. (7) Tradução das proteínas beta. (8) Replicação do genoma. (9) Transcrição dos genes gama. (10) Tradução das proteínas gama. (11) Início da morfogênese. (12) Aquisição do envelope por brotamento através da membrana nuclear. (13) Aquisição do envelope no aparelho de Golgi. (14) e (15) Transporte dos vírions em vesículas até a superfície celular. (16) Liberação por exocitose. (Adaptado de Flores, 2007).

A infecção de células permissivas resulta na expressão do conjunto completo de genes virais e na produção de progênie viral infecciosa, entretanto, este processo é incompatível com a sobrevivência das células e resulta inevitavelmente em lise, sendo denominado ciclo lítico (Roizman & Knipe, 2001; Flores et al., 2007). Cabe salientar, que para os membros do gênero *Varicellovirus*, pequenas modificações neste processo podem ocorrer (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter et al., 2006). A seguir a divisão e detalhamento das etapas do ciclo replicativo de BoHV-1 e BoHV-5.

2.4.1 – Adsorção

Neste processo, glicoproteínas do envelope viral reconhecem e ligam-se a receptores específicos da membrana celular. A primeira interação envolve uma ligação de baixa afinidade entre a gB e/ou gC a receptores celulares de sulfato de heparina. Esta é seguida por uma interação de alta afinidade entre a gD e a nectina 1 (membro da superfamília das imunoglobulinas), com subsequente penetração viral por fusão do envelope com a membrana celular (Li et al., 1995; Geraghty et al., 1998; Meyer et al., 1999).

2.4.2 – Fusão e penetração

A fusão do envelope viral com a membrana plasmática é seguida pela penetração do nucleocapsídeo e tegumento no citoplasma das células infectadas. Este processo requer pelo menos o envolvimento de quatro glicoproteínas: gD, gB e o heterodímero formado pela gH e gL (Liang et al., 1995; Meyer et al., 1998; Gerdts et al., 2000).

2.4.3 – Transporte

O transporte citoplasmático do nucleocapsídeo do HHV-1 e das proteínas virais contidas no tegumento em direção ao núcleo das células infectadas utiliza o complexo motor dineína associado com os microtúbulos da célula infectada (Dohner et al., 2002). Entretanto, as proteínas que auxiliam neste processo ainda são desconhecidas, acreditando-se que proteínas do tegumento (UL31, UL34) e do capsídeo (VP 26) estejam envolvidas (Reynolds, et al., 2004; Antinone et al., 2006).

2.4.4 – Expressão gênica e replicação do genoma

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

A transcrição dos genes virais é regulada temporalmente durante a infecção. Ocorre na forma de cascata e inclui a expressão cinética de três classes de genes: *immediate early* ou alfa; *early* ou beta e *late* ou gama. Os seus respectivos RNAs mensageiros são transportados para o citoplasma onde codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo viral, na replicação do DNA viral e na morfogênese de novos vírions (Wirth et al., 1989).

Dentre as proteínas codificadas pelos genes alfa, cinco proteínas denominadas *Bovine Infected Cell Protein* (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27 e

BICP47) ativam a expressão dos genes beta, dando sequência à replicação do DNA viral (Wirth et al., 1992; Geiser et al., 2005; Jones et al., 2006; Saydam et al., 2006). As beta-proteínas atuam na regulação da transcrição, suprimindo as alfa-proteínas e promovendo a expressão das gama-proteínas. Além disto, atuam no processo de replicação do genoma viral. A expressão dos genes gama é iniciada durante a replicação do DNA viral. As gama-proteínas são requeridas para a síntese da nova progênie viral (Roizman & Knipe, 2001).

Durante a replicação do DNA viral, o mesmo pode ser encontrado na forma linear ou circular. O genoma circular serve como molde para o primeiro ciclo de replicação. Este ocorre de forma bidirecional, pelo mecanismo de círculo rolante, numa estrutura inicialmente semelhante à letra theta (θ), e produz DNA concatemérico (cadeias de genomas de DNA viral recém sintetizados ligados um a um) (Jacob et al., 1979).

A estrutura resultante desta forma de replicação contém frequentemente “braços”, gerados por recombinação. A consequência disto é a formação de 4 possíveis organizações do genoma, produzida pela recombinação entre as regiões IR e a TR em torno da UL e US no DNA concatemérico. Entretanto, para BoHV-1, a região UL é fixada em uma orientação e o DNA dos vírions inclui quantidades equimolares de dois isômeros, diferentes na direção do segmento US (Severini et al., 1996; Bataille & Epstein, 1997; Schynts et al., 2003).

2.4.5 – Morfogênese

O processo de montagem das partículas víricas é denominado morfogênese. A montagem dos capsídeos acontece no núcleo das células

infectadas através da interação de determinadas proteínas virais (UL18; UL19; UL35 e UL38). Os capsídeos são preenchidos com as moléculas do DNA viral através do auxílio de várias proteínas virais (UL33; UL32; UL28; UL25; UL15; UL 26.5) (Roizman & Knipe, 2001; Mettenleiter, 2002; Mettenleiter et al., 2006).

2.4.6 – Maturação e egresso

A maturação corresponde à aquisição da capacidade infectiva pelas partículas víricas recém-formadas. Este processo envolve as etapas de formação do nucleocapsídeo (associação do DNA viral com o capsídeo) e a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral. O envelopamento dos nucleocapsídeos formados no núcleo ocorre por brotamento em vesículas derivadas do Complexo de Golgi. No citoplasma, os vírions acumulam-se dentro de vesículas para serem secretados para o meio extracelular ou ocorre a dispersão das partículas virais célula-a-célula (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter et al., 2006).

2.5 – Latência

A infecção latente é uma importante estratégia de perpetuação dos alfa herpesvírus nos seus hospedeiros e provavelmente ocorre em todos os animais que desenvolvem uma primo-infecção. Embora o principal sítio de latência sejam os gânglios sensoriais, tem sido sugerido que sítios não neuronais como tonsilas, células sanguíneas, linfonodos e baço possam ter importância no estabelecimento e reativação de infecções latentes por BoHV-1 (Winkler et al., 2000; Fuchs et al., 1999; Mweene et al., 1996).

Durante a primo-infecção, os alfa herpesvírus invadem os neurônios que inervam o sítio de replicação primária na mucosa infectada. O vírus é então transportado via fluxo axonal retrógrado para o núcleo dos gânglios neuronais associados (gânglios trigêmeos ou para-vertebrais), onde estabelece a infecção latente (Enquist et al., 2002).

Durante a infecção latente, no qual o genoma viral é funcionalmente conservado dentro do núcleo neuronal sem a produção de vírus infeccioso, o seu DNA permanece na forma episomal, fortemente associado com proteínas celulares e em um número de cópias variável (Decman et al., 2005). Há um nível de replicação viral no gânglio ainda durante a infecção primária que, juntamente com a frequência de reativações, determinam o número de cópias do genoma presente no gânglio latentemente infectado (Jacobson et al., 1998; Sawtell et al., 1998; Thompson & Sawtell, 2000).

Contrariamente à infecção lítica, na qual há uma expressão temporal de todos os genes virais, na latência somente há a presença de transcritos relacionados à latência (LTR – “latency-related transcript”) (Henderson et al., 2004). Nesta fase são produzidos os produtos relacionados à latência (LTP – “latency-related products”), que apresentam várias funções inibitórias: na apoptose, na entrada da célula na fase S e na expressão da BICP0 (Schang et al., 1996; Ciacci-Zanella et al., 1999; Geiser et al., 2002).

A reativação viral na infecção latente, que ocorre somente em uma pequena proporção dos neurônios (Jones et al., 2006), pode ocorrer após a exposição a estímulos naturais (estresse, transporte, parto, desmame) ou por tratamento com corticosteróides. Do corpo do neurônio, os capsídeos são

transportados de modo anterógrado, apresentando uma motilidade bidirecional, até alcançar a extremidade axonal (Smith et al., 2001). Os axônios estão ligados a células da mucosa que promovem a montagem e liberação viral (Enquist et al., 2002).

Na mucosa epitelial, a intensidade da multiplicação viral vai depender fundamentalmente da resposta imune adquirida pela exposição natural ao vírus ou pela vacinação (Pastoret et al., 1979). Quando ocorre de forma abundante, a multiplicação viral consequente à reativação culmina com a disseminação e possível transmissão a hospedeiros suscetíveis (Narita et al., 1978; Ackermann et al., 1982; Thiry et al., 1987).

2.6 – Subtipos de BoHV-1 e BoHV-5

O elevado nível de identidade molecular e protéica entre BoHV-1 e BoHV-5 compromete a classificação taxonômica, diagnóstico e estudos epidemiológicos desses agentes, pois dificulta o desenvolvimento de testes virológicos e sorológicos que diferenciem os mesmos e que possam ser utilizados facilmente em larga escala (Bratanich et al., 1991; Roehe et al., 1997b; Delhon et al., 2003).

O fato do BoHV-1 e BoHV-5 estarem associados a várias síndromes, como rinotraqueítes, conjuntivites, abortos, vulvovaginites, balanopostites e encefalites, levou a uma necessidade de melhor caracterizar os isolados virais. Assim, além da análise de restrição enzimática do genoma, o uso de anticorpos monoclonais (AcMs) permitiu que isolados respiratórios fossem classificados como BoHV-1.1 e isolados de doença genital como BoHV-1.2 (Engels et al., 1981; Metzler et al., 1985; Miller et al., 1991; Souza et al. 2002).

Atualmente os isolados de BoHV-1 são classificadas em 3 subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. Os subtipos 1.1 e 1.2a têm sido associados com infecções respiratórias e genitais graves e aborto; já o subtipo 1.2b tem sido isolado de infecções respiratórias e genitais mais leves (Whetstone & Miller, 1989; Edwards et al., 1991; Miller et al., 1991; Smith et al., 1995). Entretanto, a real importância biológica desta subdivisão e associação com patogenicidade não é clara ou comprovada (Van Oirschot, 1995).

Amostras de BoHV-1 isoladas de casos de encefalite desde a década de 60 só puderam ser caracterizadas como BoHV-1.3 em meados dos anos 80 pelo advento da análise molecular do DNA viral com enzimas de restrição (Engels et al., 1986; Metzler et al., 1986; Schudel et al., 1986). Posteriormente, pelo seu potencial neuropatogênico distinto, BoHV-1.3 foi classificado como BoHV-5 (Roizman et al., 1992).

Posteriormente, d'Offay et al. (1993), analisando o genoma de diferentes amostras de BoHV-5, propuseram uma subdivisão em subtipos “a” e “b”, com base nos perfis de restrição enzimática obtidos. Mais recentemente, D'Arce et al. (2002), propôs a existência de um terceiro subtipo de BoHV-5, denominado “não a, não b”. Entretanto, até o momento, nenhuma relação clínica foi atribuída a estes subtipos.

2.7 – Patogenicidade

A porta de entrada natural do BoHV-1 é a mucosa do trato respiratório superior ou genital. O contato “focinho a focinho” é a rota preferencial de transmissão, embora a transmissão por aerossóis já tenha sido demonstrada a curta distância (Mars et al., 2000). A infecção genital requer o

contato direto via monta natural ou pode ocorrer através de sêmen contaminado com vírus (Kupferschmied et al., 1986).

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

O BoHV-1 pode atingir uma variedade de tecidos e órgãos por viremia, ocasionando alterações clínicas devido à resposta inflamatória local e o dano causado pela replicação. Porém, a maioria das infecções provocadas por BoHV-1 são subclínicas e a severidade da doença é influenciada por vários fatores, tais como a virulência da amostra de BoHV-1, imunidade do hospedeiro, idade e presença de infecção bacteriana concomitante (Kaashoek et al., 1996a).

2.7.1 – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

A IBR é a forma clássica da doença provocada por BoHV-1. Apresenta alta morbidade e baixa mortalidade. No experimento realizado por Meyer et al. (2001) os terneiros inoculados com BoHV-1 mostraram sinais clínicos de rinotraqueíte entre os dias 1 e 15 pós inoculação: hipertemia (temperatura retal > 40,5 °C) entre os dias 2 e 7; descarga nasal mucopurulenta, tosse, conjuntivite e lesões ulcerativas na mucosa nasal;

anorexia com apatia entre os dias 2 e 7; tosse e estridor nasal a partir do dia 10. Vacas adultas acometidas por IBR podem diminuir drasticamente a produção de leite durante alguns dias (Hage et al., 1998; Van Schaik et al., 1999). O BoHV-5 também é capaz de causar infecções respiratórias semelhantes à IBR (Hübner et al., 2005)

2.7.2 – Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV)

Animais infectados com BoHV-1 por via vaginal podem desenvolver IPV, uma infecção manifestada pela presença de pústulas, intumescimento vulvar e descarga mucopurulenta. Normalmente é descoberta quando a fêmea levanta a cauda para realizar o ato de micção ou defecação e demora a retorná-la na posição normal. O exame interno revela pústulas ou placas de material necrótico branco e material mucopurulento no assoalho vaginal (Kahrs, 2001).

2.7.3 – Balanopostite pustular infecciosa (IPB)

Bovinos machos podem desenvolver IPB de forma clínica ou subclínica. Após um período de incubação de 1 a 3 dias, a mucosa do prepúcio e pênis tornam-se hiperêmicas. Surgem pontos avermelhados que tendem a formar pápulas, vesículas e pústulas. Estas lesões podem coalescer formando placas e úlceras e infecções bacterianas secundárias podem resultar em áreas cobertas com secreção branco-amarelada até lesões hemorrágicas (Van Oirschot et al., 1995). Vogel et al. (2004), após a inoculação experimental em machos não observaram aumento da temperatura corpórea nos animais inoculados durante a infecção aguda e a maioria dos animais desenvolveu balanopostite clínica entre os dias 3 e 11 pós inoculação.

2.7.4 – Aborto

Aborto é uma consequência da infecção do trato respiratório ou genital pelo BoHV-1 em vacas soronegativas. Normalmente o aborto ocorre no terço final da gestação, entretanto este período pode ser bastante variável. O intervalo entre a exposição e o aborto pode variar de 1 semana até vários meses (Kahrs, 1977; Kirkbride, 1992; Miller et al., 1995). Há relato da identificação de BoHV-5 recuperado de casos de aborto (Schudel et al., 1986). Além de aborto, podem ocorrer quadros de endometrite, ooforite, mortalidade embrionária com retorno ao cio, natimorto e nascimento de animais fracos (Miller & van der Maaten, 1984; Kahrs, 2001).

2.7.5 – Encefalite

BoHV-1 e BoHV-5 replicam de maneira similar na mucosa nasal após a inoculação, mas diferem no potencial neuropatogênico. A infecção do epitélio nasal por BoHV-1 e BoHV-5 é seguida pela invasão de terminações nervosas dos neurônios que se localizam na mucosa nasal (Meyer et al., 2001). Os alfa herpesvírus neurotrópicos, BoHV-5 e o *Herpesvírus suíno tipo 1* (SuHV-1), invadem terminações dos nervos olfatório e trigêmeo na mucosa nasal e alcançam o bulbo olfatório e gânglios trigêmeos. Estas duas rotas representam o principal caminho para a neuroinvasão viral em direção ao SNC (Gerdtts et al., 2000). Por outro lado, o BoHV-1 se detém à rota trigeminal e geralmente estabelece a infecção latente nos gânglios trigêmeos, sendo somente esporadicamente responsável por encefalites (D'Offay et al., 1993; Horiuchi et al., 1995; Ely et al., 1996; Roels et al., 2000; Silva M. et al., 2007).

A encefalite herpética é uma doença aguda e fatal provocada por BoHV-5, apresenta baixa morbidade e alta mortalidade (até 100%). A maioria dos animais acometidos é jovem, com até dois anos de idade (Lemos, 2005). A doença clínica é caracterizada por tremores, opistótono, cegueira, convulsões, bruxismo, incordenação motora e morte (Belknap et al., 1994; Meyer et al., 2001; Vogel et al.; 2003; Hübner et al., 2005; Silva et al.; 2006).

Nos animais que apresentam encefalite, vírions, antígenos e o DNA de BoHV-5 são encontrados frequentemente no gânglio trigêmeo, córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo e cerebelo (Meyer et al., 2001; Vogel et al.; 2003, Hubner et al., 2005). A principal alteração histológica observada é uma meningoencefalite não supurativa necrosante no córtex cerebral (Perez et al., 2002; Lemos, 2005; Rissi et al., 2008).

2.8 – Epidemiologia

O BoHV-1 é um patógeno amplamente disseminado no mundo, apresentando significativas diferenças de incidência e prevalência em relação à região geográfica, tipo de exploração pecuária (corte, leite, intensiva, extensiva) e à metodologia de diagnóstico empregada (Ackermann & Engels, 2006). Além de bovinos, inquéritos sorológicos em diferentes países têm demonstrado anticorpos anti-BoHV-1 em numerosas espécies de outros ruminantes: cabras, búfalos, ovinos e em uma variedade de ruminantes selvagens (Sausker & Dyer, 2002; Rajkhowa et al., 2004; Thiry et al., 2006; Lata et al., 2008).

Na Europa, as infecções pelo BoHV-1 apresentam prevalência variada. Enquanto Dinamarca, Suíça, Finlândia e Áustria têm conseguido eliminar o vírus através de testes sorológicos e remoção de animais infectados,

outros países apresentam percentuais que variam entre 35,0 a 54,4 % (Castrucci et al., 1997; Rusvai & Fodor, 1998; Boelaert et al., 2000; Ackermann & Engels, 2006; Stilwell et al., 2007). Na América do Norte a infecção tem caráter endêmico com índices de prevalência elevados (Darcel, 1973; Rebhun et al., 1978; Booker et al., 1999; Cárdenas et al., 2006). A infecção também tem sido bastante pesquisada e detectada em países da África e Ásia, com índices de prevalência que podem ser comparáveis a de outros continentes (Achour & Moussa, 1996; Kampa et al., 2004; Alkan et al., 2005; Deka Ramneek et al., 2005; Jain, 2006; Tan et al., 2006; Yan et al., 2008). Estudos de prevalência de BoHV-1 na Austrália têm demonstrado a presença deste agente. Um recente estudo de larga escala envolvendo a tipificação de 120 isolados australianos de bovinos demonstrou que somente o BoHV-1, subtipo 1.2b, está presente na Austrália (Animal Health Australia, 2008). Igualmente, o BoHV-1.2b é o subtipo predominante de BoHV-1 em bovinos da Nova Zelândia (Wang et al., 2006).

Com relação à América do Sul, levantamentos epidemiológicos e identificação de surtos realizados na Argentina, Uruguai e Colômbia demonstram o caráter endêmico das infecções por BoHV-1, com a frequência de animais sororreagentes variando de 8,8% a 84,1% (Ódeon et al., 2001; Guarino et al., 2008; OIE, 2008). No Brasil, levantamentos sorológicos realizados por todo o país têm demonstrado alta frequência de animais e rebanhos soropositivos com índices que variam de 22,2% a 83,0% (Cerqueira et al., 2000; Médici et al., 2000; Takiuchi et al., 2001; Vieira et al., 2003; Barbosa et al., 2005; Quincozes, 2005; Dias, 2006; Del Fava et al., 2007).

A distribuição do BoHV-5 é mais restrita, sendo que este é encontrado principalmente em países do Hemisfério Sul. Um dos primeiros isolados de BoHV-5 é australiano (French, 1962; Smith et al., 1995). Nos EUA casos isolados de meningoencefalites por BoHV-5 já foram documentados (D'Offay et al., 1993; Ely et al., 1996; Ashbaugh et al., 1997). Entretanto, surtos de meningoencefalite têm sido detectados no Brasil, Argentina e Uruguai (Schudel et al., 1986; Salvador et al., 1998; Pidone et al., 1999; Silva, et al., 2007). Nestes países, a presença de BoHV-5 ocasiona reações sorológicas cruzadas com BoHV-1, podendo mascarar e interferir nos índices de prevalência de ambos os vírus (Roehe et al., 1997b; Petzhold et al., 2001).

2.9 – Diagnóstico

2.9.1 – Diagnóstico presuntivo

A presença de pústulas que coalescem para formar lesões necróticas brancas aderentes na mucosa respiratória, genital ou conjuntival, embora, não patognomônico, é um indício para o diagnóstico clínico. Quando os sinais clínicos e o histórico sugerem IBR, estas lesões suportam um achado de campo, o qual deve ser confirmado pelo diagnóstico laboratorial (Kahrs, 2001).

2.9.2 – Diagnóstico laboratorial

A confirmação laboratorial da suspeita de infecção por BoHV-1 e BoHV-5 pode ser obtida por isolamento viral, testes sorológicos, imunohistoquímica, ou identificação do DNA viral por técnicas moleculares (Kahrs, 2001).

2.9.2.1 – Diagnóstico virológico

O diagnóstico virológico se baseia no isolamento viral a partir de secreções ou tecidos de animais infectados seguido da identificação de antígenos virais expressos no cultivo celular. Para ser possível, é necessário que a amostra clínica contenha número suficiente de partículas virais infecciosas. Para sua execução, suspensões de tecidos ou secreções são inoculadas sobre cultivos celulares. Após um período variável de incubação, a presença de vírus é evidenciada pelo efeito citopático (ECP) característico do vírus e a sua identificação, por uso de anticorpos específicos, aplicando-se as técnicas de imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase (IPX) (Weiblen et al., 1992; Roehe et al., 1997b). Estas técnicas também podem ser aplicadas buscando-se a identificação de células contendo antígenos virais em secreções ou tecidos (Roehe et al., 1997b).

2.9.2.2 – Diagnóstico sorológico

Usualmente, na maioria dos laboratórios, o diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1 ou 5 é realizado através de testes de vírus neutralização (VN) e ensaios do tipo ELISA (Osório et al., 1989; Bratanich et al., 1990; Roehe et al., 1997b; Takiuchi et al., 2001; Spilki et al., 2005; Cárdenas et al., 2006).

a) Vírus neutralização (VN)

A VN é considerada a técnica padrão para detecção de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1 (OIE, 2004). O período de incubação para neutralização do vírus através dos anticorpos pode variar de 1 a 24 horas e o resultado da prova é usualmente obtido em três a cinco dias (Perrin et al., 1993; Kramps et al., 1996; Kramps et al., 2004).

Entretanto, a VN não permite uma diferenciação clara entre animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5. Cerca de 92 % dos animais infectados com BoHV-1 e BoHV-5 apresentam reações cruzadas à VN quando a prova é realizada frente a ambos os vírus, ressaltando o alto grau de reatividade cruzada existente entre estes (Roehe et al., 1997b; Teixeira et al., 1998).

b) Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Existem no comércio mundial vários tipos de ELISA (do inglês “enzyme linked immunosorbent assay”) disponíveis para diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1, porém poucos para BoHV-5 (Payment et al., 1979; Cho & Bohac, 1985; Kramps et al., 1994; Graham et al., 1997; Van Oirschot et al., 1997; Teixeira et al., 2001; Wellenberg et al., 2001; Kramps et al., 2004). No entanto, assim como em VN, alguns autores relatam a ocorrência de reações cruzadas quando amostras positivas para BoHV-5 foram analisadas (Meyer et al., 2001; Teixeira et al., 2001; Wellenberg et al., 2001).

No Brasil, o uso de testes de ELISA comerciais tem sido dificultado em função do custo e demora na aquisição dos mesmos. Em função disso, em alguns laboratórios, testes do tipo ELISA desenvolvidos e produzidos internamente tem sido utilizados (Teixeira et al., 2001; Ferreira et al., 2005; Spilki et al., 2005).

2.9.2.3 – Diagnóstico molecular

A análise genômica por restrição enzimática tem sido importante na subtipagem de vírus associados com síndromes clínicas específicas (Engels et al., 1981; Misra et al., 1983; Darce et al., 2002).

A aplicação de técnicas de detecção de ácidos nucléicos tem revolucionado o diagnóstico de infecções virais, especificamente pelo desenvolvimento da PCR, descrita por Saiki et al. (1985), que iniciou um período, ainda em progresso, de rápida evolução nos laboratórios de diagnóstico virológico (Storch, 2001).

a) Análise genômica por restrição enzimática (REA)

Este tipo de análise é voltado para a caracterização genômica de amostras já isoladas, sendo, desta forma, dependente de isolamento ou multiplicação do vírus em cultivo celular, para posterior extração e clivagem do DNA viral com enzima(s) de restrição. Uma vez realizadas as digestões enzimáticas, os produtos obtidos são analisados em gel de agarose a fim de determinar o perfil de restrição do DNA clivado (Metzler et al., 1985; Engels et al., 1986; Bulach & Studdert, 1990; Edwards et al., 1990; D'Offay et al., 1993; Pidone et al., 1999; D'Arce et al., 2002).

b) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR tem como objetivo a amplificação de uma região alvo no DNA viral. Apresenta como vantagens alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução e aplicação em diferentes amostras clínicas. Além disto, pode ser utilizada em amostras que contém vírus inativado ou que mantém o vírus no estado latente (DeBiasi & Tyler, 2004).

Diversas provas de PCR têm sido desenvolvidas utilizando oligonucleotídeos iniciadores para genes específicos de BoHV-1 e BoHV-5 (Van Engelenburg et al., 1993; Wagter et al., 1996; Claus et al., 2005; Afonso et al., 2007; Esteves et al., 2008).

A necessidade do desenvolvimento de metodologias capazes de distinguir a infecção por BoHV-1 e BoHV-5 tem levado à padronização de PCRs diferenciais (Ashbaugh et al., 1997; Ros et al., 1999; Alegre et al., 2001; Claus et al., 2005). Além disto, com a produção de vacinas marcadoras, tem-se desenvolvido testes de PCR para detectar a gE em animais naturalmente infectados (Schynts et al., 1999).

2.10 – Vacinação e controle

Considerando-se que o BoHV-1 e BoHV-5 apresentam características biológicas e epidemiológicas similares, as mesmas medidas para o controle da infecção pelos dois vírus devem ser adotadas (Meyer et al., 2001).

Dentre as medidas de controle, a mais utilizada é a vacinação. Embora não seja capaz de prevenir as infecções por BoHV-1 e/ou BoHV-5, o uso de vacinas reduz a severidade da doença, a replicação e a excreção viral, diminuindo significativamente a circulação viral nos rebanhos vacinados (Ackermann & Engels, 2006).

Vários países da Europa têm iniciado programas de controle objetivando a erradicação de BoHV-1 baseados no uso de vacinas marcadoras com o gene da glicoproteína E deletado (gE⁻). Estas vacinas marcadoras, ao contrário das convencionais, quando utilizadas junto com a detecção sorológica de anticorpos específicos anti-gE, permitem a discriminação entre animais infectados e vacinados e a posterior eliminação dos animais infectados (portadores) dos rebanhos (Van Oirschot et al., 1996; Van Oirschot et al., 1997; Mars et al., 2001; Lehmann et al., 2002). Alguns países europeus têm

conseguido com sucesso a erradicação de BoHV-1 sem vacinação. Nestes países, a população de bovinos é relativamente pequena e o movimento de animais pode ser facilmente controlado (Ackermann & Engels, 2006).

Além do uso de vacinas, a vigilância constante por meios sorológicos é necessária para a manutenção do estado livre de herpesvírus bovinos. O movimento de bovinos soropositivos e o comércio de sêmen positivo para BoHV-1 devem ser evitados, pois são o principal meio de re-introdução do vírus em rebanhos livres (Kupferschmied et al., 1986; Six et al., 2001; Kahrs, 2001).

Em relação aos EUA e a outros países, a erradicação pode ser difícil, talvez impossível e muito onerosa (Jones & Chowdhury, 2008). Além disto, o fato da vacinação ser amplamente utilizada nestes países contribui para alta soroprevalência de BoHV-1 (e, conseqüentemente, impossibilita a identificação de animais não infectados, mesmo que vacinados) (Van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2006).

Acredita-se que os intensivos programas de vacinação contra BoHV-1 usados em países do Hemisfério Norte podem estar relacionados à baixa prevalência de encefalites herpéticas nestas regiões (Ackermann & Engels, 2006). No Brasil, assim como em outros países da América do Sul, existem várias vacinas comerciais contra BoHV-1. Entretanto, programas intensivos de vacinação não existem, o que, além da presença de um rebanho grande, falta de outras medidas de controle e ampla disseminação de BoHV-1 e BoHV-5, favorece a manutenção e distribuição destes vírus na população (Metzler et al., 1986; Silva M. et al., 2007; Campos et al., *in press*).

Finalmente, cabe salientar, que apesar de existirem no mercado várias vacinas contra infecções pelo BoHV-1, até o presente existem poucas vacinas contra infecções pelo BoHV-5. O nível de proteção cruzada fornecido por vacinas anti-BoHV-1 frente a infecções pelo BoHV-5 pode não ser suficiente para induzir proteção clínica satisfatória (Silva et al., 2006). O desenvolvimento de vacinas eficazes contra infecções por BoHV-5 poderá contribuir para o controle deste vírus em áreas endêmicas.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Células e vírus

Células renais de bovino Madin-Darby (MDBK), sub-linhagem de ATCC CCL-22 foram utilizadas para a multiplicação e titulação viral. Os cultivos celulares foram mantidos em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM, *Gibco*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, *Cultilab*), antibiótico (2 mg/L de enrofloxacin, *Baytril/Bayer*) e antifúngico (2,0 µg/ml de anfotericina B, *Cristália*).

As amostras virais de BoHV-1 (EVI 123/98) e de BoHV-5 (EVI 88/95) utilizadas neste estudo são oriundas do estoque de vírus do Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), isoladas respectivamente em 1998 e 1995 (Roehe et al., 1997a; Darce et al., 2002).

3.2 – Coleta de gânglios trigêmeos

Gânglios trigêmeos de 200 bovinos de diversas raças, 64 machos e 136 fêmeas, com idade média de 4 anos, oriundos de 40 municípios gaúchos, foram coletados em um frigorífico localizado no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) (Fig. 4). As cabeças dos animais recém abatidos, selecionados ao acaso, foram abertas com uma serra elétrica para retirada do cérebro. Em seguida, os gânglios trigêmeos foram coletados, aos pares, com material cirúrgico estéril (pinças, bisturi, tesouras).

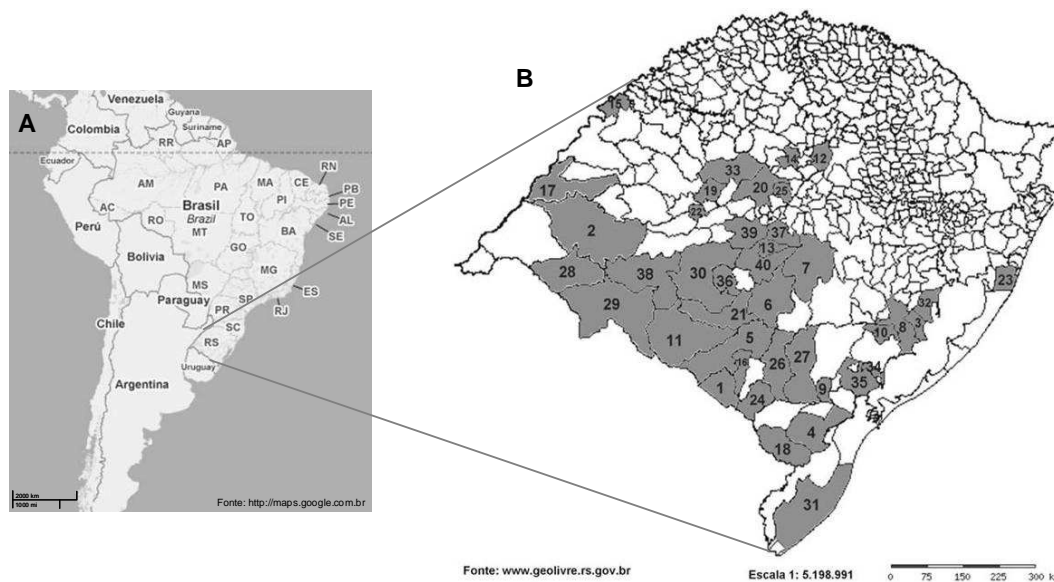


FIGURA 4. A – Mapa da América Latina. **B** – Mapa do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) com os municípios de origem dos animais coletados enumerados em destaque (número de animais coletados por município): 1- Aceguá (9), 2- Alegrete (1), 3- Arambaré (2), 4- Arroio Grande (24), 5- Bagé (10), 6- Caçapava do Sul (11), 7- Cachoeira do Sul (12), 8- Camaquã (7), 9- Cerrito (2), 10- Cristal (3), 11- Dom Pedrito (3), 12- Espumoso (2), 13- Formigueiro (2), 14- Fortaleza dos Valos (1), 15- Garruchos (1), 16- Hulha Negra (10), 17- Itaqui (3), 18- Jaguarão (20), 19- Jari (1), 20- Júlio de Castilhos (2), 21- Lavras do Sul (2), 22- Mata (5), 23- Palmares do Sul (4), 24- Pedras Altas (4), 25- Pinhal Grande (9), 26- Pinheiro Machado (1), 27- Piratini (5), 28- Quaraí (2), 29- Santana do Livramento (2), 30- São Gabriel (2), 31- Santa Vitória do Palmar (1), 32- Tapes (8), 33- Tupanciretã (2), 34- Turuçu (10), 35- Pelotas (2), 36- Santa Margarida do Sul (1), 37- Restinga Seca (6), 38- Rosário do Sul (3), 39- Santa Maria (4), 40- São Sepé (1).

Durante a coleta, os gânglios foram identificados conforme o número da carcaça (para conhecimento do sexo e origem do animal coletado), armazenados individualmente em placas de seis cavidades estéreis, mantidos e transportados refrigerados em isopor com gelo. No laboratório, estas amostras foram dissecadas, dispostas individualmente em placas de 24 cavidades estéreis e congeladas a -70°C até o processamento.

3.3 – Coleta e processamento das amostras de sangue

Dez mililitros de sangue de todas as 200 cabeças foram coletados em tubos de ensaio estéreis identificados com a mesma numeração da carcaça. Estas amostras foram mantidas refrigeradas até o laboratório. Após a

coagulação, foi realizada a centrifugação a 3000 RPM durante 10 minutos (*Damon/IEC Divison*) para a obtenção da fração do soro de cada amostra. Estes foram armazenados em microtubos de 1,5 ml e mantidos congelados a -20 °C até a realização da vírus neutralização.

3.4 – Testes de vírus neutralização (VN)

Os testes de VN foram realizados seguindo as normas da OIE (OIE, 2004). Primeiramente, os soros foram inativados durante 30 minutos a 56 °C. Diluições seriadas na base dois foram feitas em meio de cultivo utilizando microplacas de 96 cavidades estéreis. Os testes foram realizados em duplicatas utilizando 50 µl por poço de cada soro. Os soros diluídos foram misturados com 50 µl das amostras de vírus contendo 100 – 200 TCID₅₀ (doses infectantes em 50% do cultivo celular). Controles positivos, fraco-positivos e negativos foram também incluídos no teste. O controle da diluição viral foi realizado com diluições na base 10 do vírus estoque com meio de cultura. Em seguida as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ (*Forma Scientific*). Posteriormente foram adicionados 100 µl de uma suspensão contendo 3 x 10⁴ células por poço e as placas foram incubadas por 3 a 5 dias. A leitura foi realizada a partir do 2º dia, a cada 24 horas, até o 5º dia para a presença ou não do efeito citopático característico de BoHV. O título de anticorpos neutralizantes nos soros foi calculado utilizando o método de Red e Muench (1938).

3.5 – Extração de DNA total

Fragmentos de gânglios trigêmeos com cerca de 200 µg foram submetidos à digestão em 1 ml de solução de lise [20 mM de Tris-HCl

(*Invitrogen*), pH 7,4; 10 mM de EDTA (*Invitrogen*), pH 8,0; 200 mM de NaCl (*Nuclear*); 100 µg de proteinase K (*USB Corporation*); 10 % de SDS (*Promega*)] e incubados por 12 horas (uma noite) a 37 °C. Após a incubação, esta mistura foi centrifugada (*Centrífuga Sigma 2-16PK*) a 12.000 x g por 10 minutos para precipitar o material não digerido, e 400 µl do sobrenadante foram coletados. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA com igual volume de fenol (*Invitrogen*) e a precipitação com etanol (*Pro-analysis*) segundo Sambrook & Russell (2001). O DNA purificado foi então dissolvido em 200 µl de TE (10 mM de Tris, pH 7,4 e 1 mM de EDTA, pH 8,0). A análise da quantidade e qualidade do DNA obtido foi realizada submetendo 10 µl da amostra à eletroforese em gel de agarose (*Invitrogen*) a 1 % e comparando com quantidades conhecidas do DNA do bacteriófago Lambda (*Fermentas*).

3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase

Os oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR foram desenhados com base nas sequências do gene que codifica a gC de ambos BoHV-1 e BoHV-5, as quais estão disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oligonucleotídeos (iniciador direto - PF 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3' e reverso - PR 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3') anelam em regiões conservadas de ambos os vírus, amplificando um produto de 575 e 572 pb, respectivamente, em BoHV-1 e BoHV-5 (Esteves et al., 2008). Em todas as reações de PCR e nested PCR realizadas foram utilizados 200 ng de DNA total de gânglio trigêmeo.

3.6.1 – Otimização das condições de amplificação da PCR

A fim de detectar o menor número possível de genomas de BoHV presente nos gânglios foi necessário otimizar a PCR descrita por Esteves et al. (2008). Primeiramente, diferentes concentrações (100 a 800 ng) de DNA total extraído dos gânglios trigêmeos foram submetidas a amplificações. Em seguida, várias concentrações de $MgCl_2$ (1,0 a 3,0 mM) e de oligonucleotídeos (0,2 a 0,4 μM) foram testadas. Em adição, foi examinado se o acréscimo de dimetilsulfóxido (5; 10 e 12 %) poderia facilitar a amplificação, dado o alto conteúdo de GC da região amplificada (72 %). Paralelamente foram testadas diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos (62, 63, 64 e 65 °C).

A condição ótima de amplificação numa reação de 25 μl foi obtida com 200 ng de DNA total extraído de gânglio trigêmeo; 1 mM de $MgCl_2$ (*Invitrogen*); 0,3 μM de cada oligonucleotídeo (*IDT*); 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO; *Acros Organics*); 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*); 10 % de tampão de PCR (*Invitrogen*) e 0,6 mM de deoxinucleosídeos trifosfatos (*ABgene*) por reação.

As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Eppendorf sob as seguintes condições: 5 minutos (min) de desnaturação inicial a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94 °C (de snaturação); 1 min a 62 °C (anelamento); 1 min a 72 °C (extensão) e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C. Os produtos foram analisados por eletroforese em tampão TAE pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose de

1,5 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e comparado com marcadores de peso molecular [pUC19 x *Hinf* I, 100 bp DNA ladder (*BioLabs*)].

3.6.2 – Construção do controle interno

O controle interno (CI) utilizado nesta PCR é um fragmento de DNA que pode ser amplificado com os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento alvo, diferenciando-se do mesmo pelo menor tamanho.

O CI foi construído inserindo o produto da PCR de 575 pb de BoHV-1 (amostra EVI 123/98) no plasmídeo I (vetor pCR 2.0 TOPO, *Invitrogen*). Em seguida foi realizada a clivagem com a enzima de restrição *Bsm*BI, que cliva somente o inserto, em dois sítios, e remove deste um fragmento de 135 pb. O resultado desta deleção é representado pelo plasmídeo II com o tamanho final de 440 pb (Fig. 5).

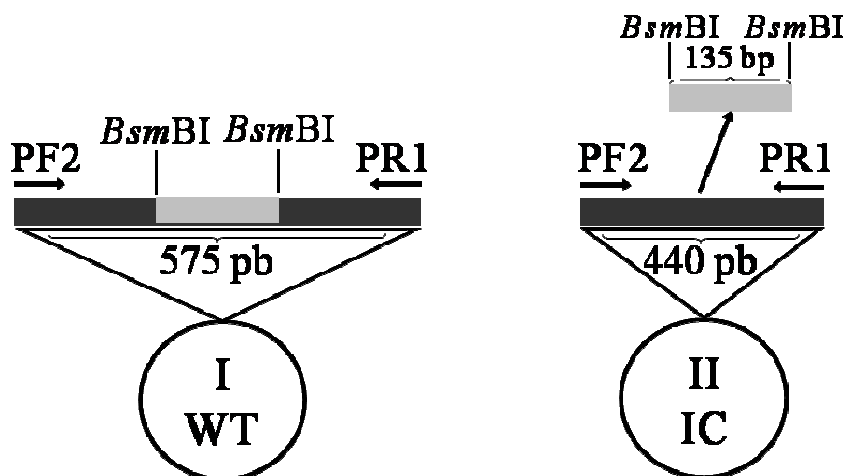


FIGURA 5 – Construção de uma sequência de controle interno. I: representa o plasmídeo na qual a região amplificada foi clonada (WT – tipo selvagem). Esta região (retângulo preenchido) consiste de 575 bp da sequência da gC de BoHV-1 amplificada por dois oligonucleotídeos (PF2) 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3' e (PR1) 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3'. II: representa o produto da clivagem com enzima de restrição *Bsm*BI e religação com a enzima T4 DNA ligase (IC – controle interno).

Após a clivagem, o plasmídeo II foi submetido à eletroforese em agarose LMP (“low melting point”, *Invitrogen*) para o isolamento do DNA

plasmideal, o qual foi religado com o auxílio da enzima T4 DNA ligase e inserido por transformação em células de *Escherichia coli* DH5 α competentes. Estas foram multiplicadas em meio LB (Luria Bertani) com ampicilina (50 μ g/ml) a 37 °C. Finalmente, o DNA plasmideal foi extraído pelo método de minipreparação descrito por Sambrook & Russel (2001).

3.6.3 – Sensibilidade da PCR

A sensibilidade de amplificação da PCR foi determinada, utilizando diluições decimais seriadas de quantidades conhecidas de moléculas do CI, de duas formas. Primeiro, comparando igual quantidade do CI e DNA viral misturados, a fim de testar se havia diferença na eficácia de amplificação entre o CI e o produto alvo. Segundo, com uma quantidade fixa de DNA total de gânglios (200 ng) para verificar uma possível perda de sensibilidade com a presença do DNA bovino.

3.6.4 – Quantificação do DNA de BoHV nos gânglios

Em cada reação de PCR das amostras uma quantidade fixa (25 moléculas) de controle interno foi adicionada para detectar resultados falso-negativos. Comparando-se a intensidade de amplificação das duas bandas, foi possível determinar, de uma maneira semiquantitativa, quantas moléculas de BoHV-1 ou 5 estavam presentes nas amostras originais de gânglios trigêmeos.

3.6.5 – Detecção de resultados falso-positivos

A cada 5 reações de amplificação de amostras de gânglios foram adicionadas reações controles negativo (DNA extraído de gânglio não infectado) e branco (água ao invés de DNA).

3.7 – Nested PCR

A diferenciação entre os produtos de amplificação de BoHV-1 e BoHV-5 foi realizada através de duas novas reações de amplificação, uma para BoHV-1 e outra para BoHV-5, utilizando os produtos obtidos na primeira PCR. Os oligonucleotídeos foram desenhados aos pares especificamente para cada vírus. A detecção do DNA de BoHV-1 foi realizada utilizando os oligonucleotídeos: PF 5'-CTAACATGGAGCGCCGCTT-3' e PR 5'-CGGGGCGATGCCGTC-3', que renderam um produto de 161 pb. Para detectar o DNA de BoHV-5, um par de oligonucleotídeos (PF 5'-GTGGAGCGCCGCTTCGC-3' e PR 5'-TATCGCGGAGAGCAGGCG-3') foi utilizado e o tamanho do produto originado foi de 236 pb.

3.7.1 – Otimização das condições de amplificação da nested PCR

A reação de nested PCR foi padronizada visando principalmente uma alta especificidade. Para isto, várias concentrações de $MgCl_2$ (1,0 a 3,0 mM) e de oligonucleotídeos (0,2 a 0,4 μM) foram testadas. Em adição, foram testadas diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (5, 10, 12 e 14 %) e, paralelamente, diferentes temperaturas de anelamento (61, 62, 63, 64 e 65 °C).

A condição ótima de amplificação numa reação de 25 μl foi obtida com 1 mM de $MgCl_2$ (*Invitrogen*); 0,2 μM de oligonucleotídeo direto (*IDT*); 0,2 μM de oligonucleotídeo reverso (*IDT*); 10 % de dimetilsulfóxido (*DMSO*; *Acros Organics*); 0,6 mM de deoxinucleosídeos trifosfatos (*ABgene*); 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e 1 x tampão de PCR (*Invitrogen*) por reação. Além

disto, em todas as reações foi utilizado 1 μ L da reação da primeira PCR como DNA molde.

A temperatura e o tempo de cada etapa da reação foram os seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos contendo: uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, uma de anelamento a 61°C por 1 min e uma de extensão a 72° C por 1 min; além disto, uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min foi realizada.

Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), visualizados sob luz UV e comparados com marcadores de peso molecular conhecidos [pUC19 x *Hinf* I, 100 bp DNA ladder (*BioLabs*)].

3.8 – Sequenciamento dos produtos

A fim de confirmar a especificidade da PCR e o perfil dos amplificados da nested PCR, o sequenciamento de alguns produtos, selecionados ao acaso, foi realizado. Estes produtos foram inicialmente clonados utilizando o kit TOPO TA Cloning® contendo o vetor pCR®2.1 (*Invitrogen*). Em seguida foi realizado o plaqueamento em agar LB com 50 μ g/mL de ampicilina (*Merck*), e as colônias presentes após a incubação (24 h a 37 °C), foram multiplicadas sob agitação em meio LB (Luria-Bertani) contendo 50 μ g/mL de ampicilina durante 12 horas a 37°C. Finalmente o DNA plasmideal foi extraído pelo método de minipreparação descrito por Sambrook & Russel (2001).

O próximo passo foi o envio do DNA plasmideal em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 6 μ L de: 100 a 250 ng de DNA molde

(plasmídeo) e 4,5 pmol de primer ao Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) para sequenciamento, sendo enviados, pelo menos, dois tubos de cada amostra (um com o oligonucleotídeo iniciador direto e o outro com o reverso). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (*Applied Biosystems*), de acordo com as recomendações do fabricante.

4 – RESULTADOS

4.1 – Testes de vírus neutralização

A prevalência de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1 e/ou 5 foi realizada em todos os 200 bovinos utilizados neste estudo. Os resultados dos testes de VN para detectar anticorpos neutralizantes tanto para BoHV-1 como para BoHV-5 revelaram uma prevalência de anticorpos total de 49,5% (44,0 % para BoHV-1; 41,5 % para BoHV-5). Aproximadamente 72,0 % reagiram contra ambos os tipos virais (Tab. 1).

TABELA 1. Resultados do teste de vírus neutralização para BoHV-1 e BoHV-5.

Soros	BoHV-1 ^a		BoHV-5 ^b		BoHV-1 ^a /BoHV-5 ^b	
	Número	%	Número	%	Número	%
Positivos	88	44,0	83	41,5	99	49,5
Negativos	112	56,0	117	58,5	101	50,5
Total	200	100,0	200	100,0	200	100,0

^a BoHV-1: amostra EVI 123/98.

^b BoHV-5: amostra EVI 88/95.

4.2 – Extração do DNA total de gânglios

A Fig. 6 apresenta o resultado da extração de DNA de alguns gânglios trigêmeos. O protocolo de extração utilizado resultou, consistentemente, em DNA relativamente íntegro e de concentração homogênea, como exemplificado na figura abaixo.

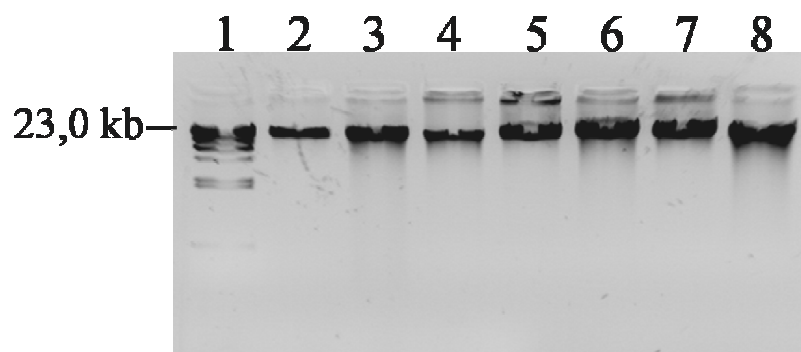


FIGURA 6: Imagem de gel de agarose a 1 % contendo DNA total extraído dos gânglios trigêmeos. 1: Marcador λ x *Hind* III, 2: 400nm de DNA bacteriófago Lambda, 3 - 8: dez microlitros de DNA total extraído de gânglios trigêmeos de bovinos.

4.3 – Utilização de controle interno na PCR

O CI adicionado em todas as reações de PCR originou um fragmento de 440 pb. A presença do CI na ausência do produto viral foi interpretada como ausência de DNA viral ou, pelo menos, ausência de DNA em quantidades detectáveis por este método. Por outro lado, a ausência de ambos, o produto viral e o CI, implicaram em uma falha na amplificação, o que poderia ser considerado um resultado falso negativo. As amostras de DNA de gânglios que depois de várias tentativas falharam em permitir a amplificação do CI foram consideradas como resultados não interpretáveis, o que ocorreu em 2,5 % das amostras (Tab. 2).

4.4 – Sensibilidade da PCR

A sensibilidade da PCR foi determinada com amplificações utilizando diluições seriadas na base 10 do CI. Além disto, foi realizada a co-amplificação do CI e DNA viral para checar diferenças na eficácia da amplificação. Os produtos de até 25 moléculas do CI e do DNA viral foram facilmente

visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio (Fig. 7, coluna 4).

Analisando a Fig. 7, podemos observar que o menor limite de detecção do teste de PCR utilizado neste trabalho esteve posicionado entre 25 e 2,5 moléculas.

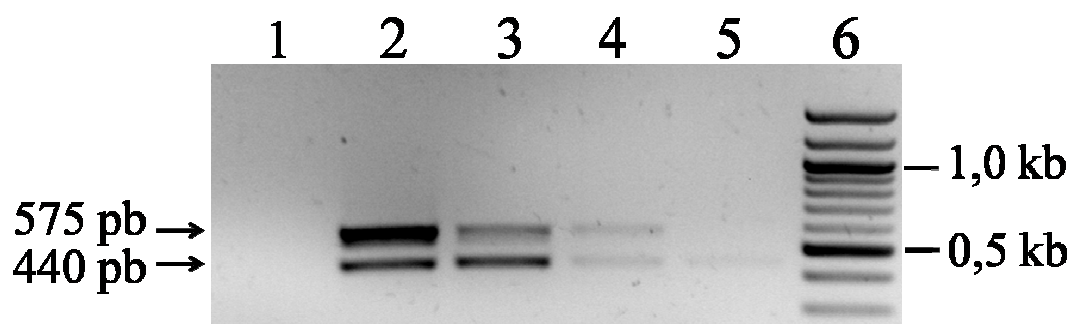


FIGURA 7: Imagem de gel de agarose a 1,5 % demonstrando a co-amplificação de quantidades conhecidas do CI e do DNA viral. 1: controle branco; 2: 2500, 3: 250, 4: 25 e 5: 2,5 moléculas do CI e do DNA viral; 6: Marcador de 100 pb (*BioLabs*).

Como na prática a PCR foi realizada utilizando 200 ng de DNA total de gânglio, a sensibilidade do teste também foi avaliada na presença de 200 ng de DNA total de gânglio trigêmeo bovino positivo para BoHV (Fig. 8).

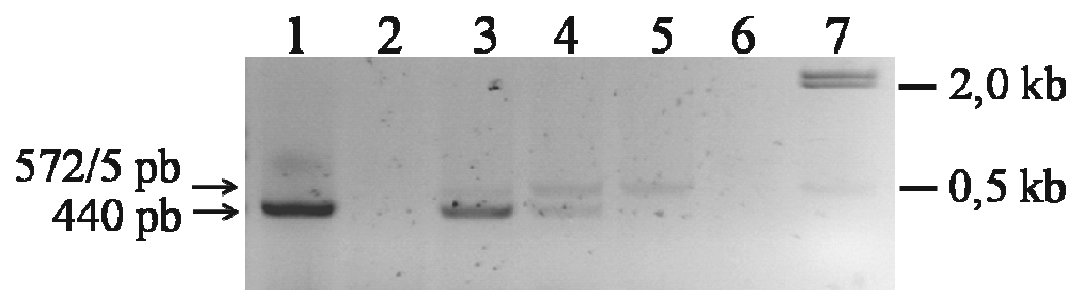


FIGURA 8: Imagem de gel de agarose a 1,5 % demonstrando a co-amplificação de quantidades conhecidas de CI e desconhecida de DNA viral presente em um gânglio positivo para BoHV. 1: 2500; 2 e 6: controle branco; 3: 250, 4: 25 e 5: 2,5 moléculas do CI; 7: Marcador *Lambda x HindIII*.

Analisando a Fig. 8, podemos observar que também na presença de 200 ng de DNA total de gânglio, 25 moléculas de CI, originaram uma banda facilmente detectável em gel de agarose (Fig. 8, coluna 4). A ausência da banda viral na presença de 2500 moléculas do CI (Fig. 8, linha 1) é devida à competição entre ambos os produtos.

4.5 – Determinação do número de cópias do genoma de BoHV nos gânglios trigêmeos

Duzentos nanogramas de DNA genômico bovino são a quantidade encontrada em 5×10^4 células bovinas (Gregory, 2005). A presença de um número conhecido de moléculas do CI na reação de PCR possibilitou a estimativa do número aproximado de genomas de BoHV presentes em uma porção do gânglio infectado latentemente. Foi demonstrado anteriormente que o fragmento do CI foi amplificado com a mesma eficiência que o fragmento do DNA viral (ver Figuras 7 e 8, colunas 4). Consequentemente, quando a intensidade das bandas de ambos os produtos de PCR, CI e fragmento viral, é a mesma, a quantidade de genomas virais encontrada em 200 ng de DNA total é de cerca de 25 moléculas. Baseando-se nestes resultados de co-amplificação, foi estimado que em 5×10^4 células de gânglios trigêmeos, até 200 cópias do genoma de BoHV podem ser detectadas, como na Fig. 9, coluna 7. Por outro lado, frequentemente poucas cópias de genoma foram detectadas em 5×10^4 células de gânglio trigêmeo (Fig. 9, coluna 2 e Fig. 9b). Isto implica que alguns gânglios, ou partes deles, podem abrigar baixos números de cópias do genoma de BoHV, menores do que o limite de detecção do teste de PCR

utilizado, e conseqüentemente, estas amostras serão consideradas negativas para presença de BoHV.

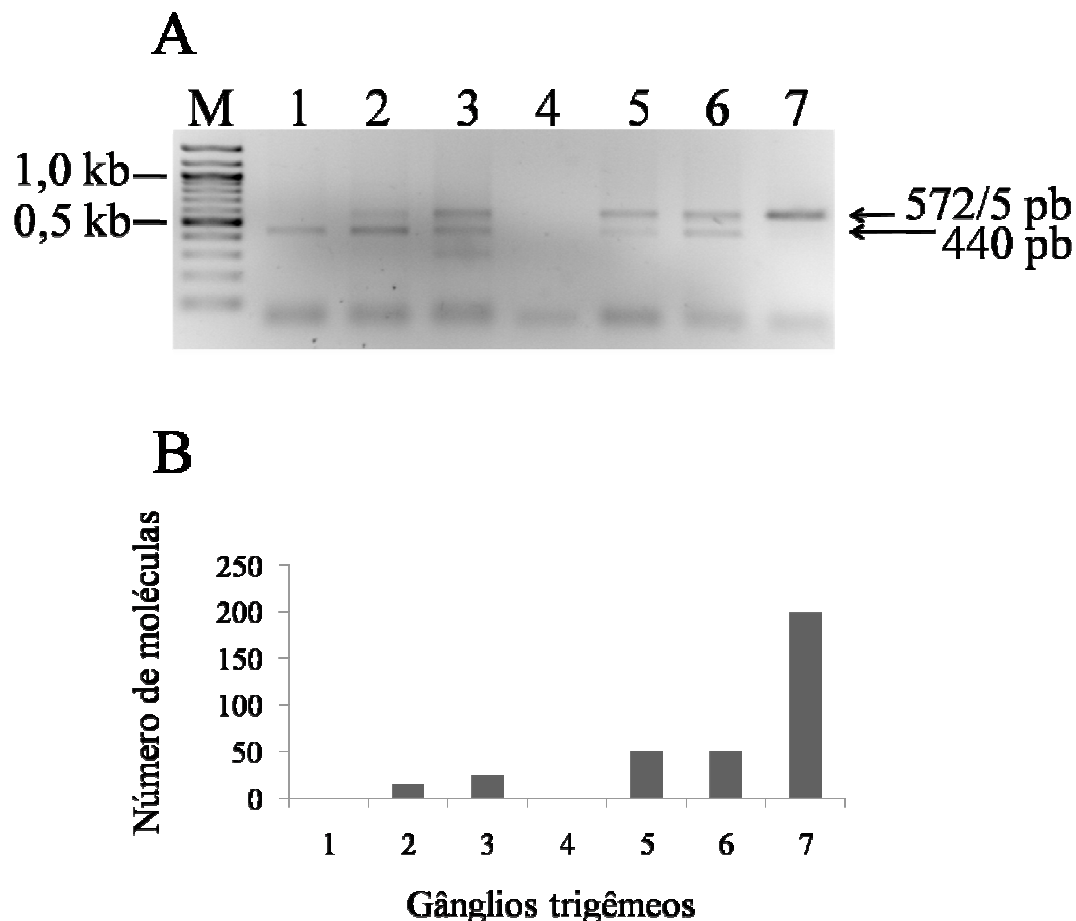


FIGURA 9: **A:** Imagem de gel de agarose a 1,5 % demonstrando o resultado da amplificação em amostras de gânglios na presença de 25 moléculas de Cl. M: Marcador de 100 pb (*BioLabs*); 1: gânglio negativo; 2, 3, 5, 6 e 7: gânglios positivos; 4: controle branco. **B:** Gráfico com o número estimado de cópias do genoma de BoHV presentes em 200 ng de DNA dos gânglios representados na Fig. 9A.

4.6 – Percentagem de bovinos positivos para a presença de genoma de BoHV em seus gânglios trigêmeos

Os resultados do teste de PCR para BoHV utilizado neste estudo demonstraram que dos 400 gânglios testados, 74,8 % (299/400) foram positivos, 20,5 % (82/400) foram negativos e 4,7 % (19/400) originaram resultados não interpretáveis (Tab. 2). Em alguns casos, somente um dos

gânglios, em relação ao par, foi positivo, provavelmente devido à distribuição não homogênea de células contendo o genoma de BoHV. Como consequência, a percentagem de animais positivos para a presença de genomas de BoHV em (pelo menos um de) seus gânglios trigêmeos foi mais alta: 87,0 % (174/200) foram positivos, 10,5 % (21/200) foram negativos e 2,5 % (5/200) com resultados não interpretáveis (Tab. 2).

TABELA 2. Resultados da PCR para presença de genoma de BoHV por gânglio trigêmeo e por animal.

		PCR			
		Total	Positivos	Negativos	NI ^a
Resultados por gânglio	N ^o	400	299	82	19
	%	100	74,8	20,5	4,7
Resultados por animal	N ^o	200	174	21	5
	%	100	87,0	10,5	2,5

^a NI (não interpretável): Nas amostras consideradas como resultado não interpretável, nem o produto viral e nem o produto de 25 moléculas de controle interno não puderam ser detectados.

4.7 – Resultados da nested PCR para BoHV-1 e BoHV-5 utilizando os produtos da primeira PCR como DNA molde

Dentro da região amplificada na primeira PCR, dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados especificamente para BoHV-1 e para BoHV-5. Utilizando os produtos amplificados da primeira PCR como molde, o par de oligonucleotídeos para BoHV-1 originou um produto de 161 pb e o par de oligonucleotídeos desenhados para BoHV-5 originou um produto de 236 pb (Fig. 10). Todos os 299 produtos da primeira PCR originaram amplificados em pelo menos uma das nested PCR tipo-específico aplicada. Em muitos casos os produtos da primeira PCR originaram resultados positivos em ambas as nested PCR tipo-específico (Fig. 10).

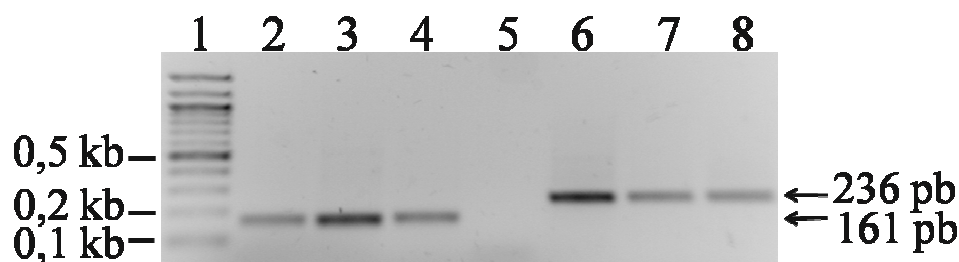


FIGURA 10: Imagem demonstrando os produtos da nested PCR e a ocorrência de co-infecções. Os produtos de três gânglios trigêmeos (GT) positivos para BoHV na PCR foram submetidos à nested PCR tipo-específico. Seis microlitros da reação de 25 μ L foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Todas as 3 amostras originaram produtos de 161 pb para BoHV-1 e 236 pb para BoHV-5. Coluna 1: Marcador de 100 pb (*BioLabs*); colunas 2 e 6: GT 277; colunas 3 e 7: GT 258; colunas 4 e 8: GT 255; coluna 5: controle branco.

Dos 174 animais positivos para BoHV, 82,8 % (144/174) foram positivos para BoHV-1, 93,1 % (162/174) para BoHV-5 e 75,9% (132/174) para ambos, BoHV-1 e BoHV-5 (Tab. 3).

TABELA 3 – Resultados da nested PCR para presença de genoma de BoHV por gânglio trigêmeo e por animal.

		nested PCR			
		Total	BoHV-1	BoHV-5	BoHV-1 e -5
Resultados	N ^o	299 ^a	38	69	192
por gânglio	%	100	12,7	23,1	64,2
Resultados	N ^o	174 ^b	12	30	132
por animal	%	100	6,9	17,2	75,9 ^c

^{a, b} A nested PCR foi realizada utilizando os produtos obtidos na primeira PCR.

^c O percentual de animais positivos para BoHV-1 e BoHV-5 foi baseado no número de animais positivos para BoHV. No total da população de 200 animais, a percentagem de co-infecções foi de 66%.

4.8 – Sequenciamento dos produtos

Doze produtos da nested PCR, 4 com perfil de BoHV-1 e 8 com perfil de BoHV-5, foram sequenciados e confirmaram o perfil encontrado na nested PCR: 4 seqüências de BoHV-1.2 e 8 de BoHV-5 (Tab. 4).

TABELA 4 – Resultado do sequenciamento dos produtos de nested PCR.

Quantidade	Gânglios	Nº de nucleotídeos sequenciados por reação	Perfil
1	64 ^(a)	161 / 161	BoHV-1.2
2	64 ^(a)	236 / 236	BoHV-5
3	73	161 / 161	BoHV-1.2
4	146	236 / 236	BoHV-5
5	148	161 / 161	BoHV-1.2
6	222	236 / 236	BoHV-5
7	507	144 / 236	BoHV-5
8	509	236 / 236	BoHV-5
9	511	236 / 236	BoHV-5
10	525	161 / 161	BoHV-1.2
11	533	236 / 236	BoHV-5
12	534	236 / 236	BoHV-5

(^a) Ocorrência de co-infecção.

As sequências de BoHV-5 resultantes, ao serem alinhadas com as sequências da gC disponíveis no GenBank através do programa NCBI Blast demonstraram pequenas diferenças na composição de nucleotídeos como as destacadas na Fig. 11A. Já com os resultados das sequências de BoHV-1, todas apresentaram 100% de identidade, como a exemplificada na Fig. 11B.

A [gb|DQ184912.1|](#) Bovine herpesvirus 5 isolate EVI 100 glycoprotein C gene, partial cds
Length=500

```

Query 1  GCCC-TTTATCGCGGAGAGCAGGCGCACGCCGCGCATGTTACACCAGCCCAGGCCGCTCAG 59
          |||||
Sbjct 439  GCCCGTCTATCGCGGAGAGCAGGCGCACGCCGCGCATGTTACACCAGCCCAGGCCGCTCAG 380

Query 60  CGCAGACGCCGCTCTGCTCGGTGCGCGAGGGCGGCTCGCGCACCGTCCAGCGCA 119
          |||||
Sbjct 379  CGCAGACGCCGCTCTGCTCGGTGCGCGAGGGCGGCTCGCGCACCGTCCAGCGCA 320

Query 120  GGGAGACCGGCTCGGGGACGCAGCGCGCCCTCGCAGACAGCCCGGGCCCTCGAAAAACA 179
          |||||
Sbjct 319  GGGAGACCGGCTCGGGGACGCAGCGCGCCCTCGCAGACAGCCCGGGCCCTCGAAGAACA 260

Query 180  CGGCGAGCTCGGGCGGGCGGTAGACGGCCGGCGTGGCAGCCGAGGCGAAACGGCGCTCC 238
          |||||
Sbjct 259  CGGCGAGCTCGGGCGGGCGGTAGACGGCCGGCGTGGCAGCCGAGGCGAAGCGGGCGCTCC 201

```

B [gb|DQ173739.1|](#) Bovine herpesvirus type 1.2 isolate EVI14 glycoprotein C (gC) gene, partial cds
Length=516

```

Query 7  CGGGGCGATGCCGTGCGCACCGTCCAGCGCAGGGAGACGCGCCCTCGGGGACGCAGCG 66
          |||||
Sbjct 352  CGGGGCGATGCCGTGCGCACCGTCCAGCGCAGGGAGACGCGCCCTCGGGGACGCAGCG 293

Query 67  CGCCTCGCAGACGGCCTCGCCGCCCTCGAAGTACACGCGCAGCTCGGGCGGGCGGTAAAC 126
          |||||
Sbjct 292  CGCCTCGCAGACGGCCTCGCCGCCCTCGAAGTACACGCGCAGCTCGGGCGGGCGGTAAAC 233

Query 127  GGCCGGCGTGCCGGCCCGTAAAGCGCGCTCCATGTTAG 167
          |||||
Sbjct 232  GGCCGGCGTGCCGGCCCGTAAAGCGCGCTCCATGTTAG 192

```

FIGURA 11: **A:** Alinhamento da sequência do gânglio 507 com a amostra de BoHV-5 (EVI 100) através do programa NCBI Blast. No detalhe (círculos tracejados), diferenças na composição de nucleotídeos. **B:** Alinhamento da sequência do gânglio 148 com a amostra de BoHV-1.2 (EVI 14) através do programa NCBI Blast.

5 – DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em 200 bovinos submetidos ao abate na região sul do Rio Grande do Sul (RS). Desta forma, foram desenvolvidas e otimizadas técnicas de PCR, as quais foram aplicadas em gânglios trigêmeos coletados destes animais. Este é o primeiro estudo em larga escala envolvendo a identificação e diferenciação de animais latentemente infectados por BoHV-1 e BoHV-5 utilizando técnicas moleculares.

Em bovinos, após a infecção intranasal com BoHV-1, o DNA viral pode ser detectado nas tonsilas e nos linfonodos intimamente relacionados com o sítio da infecção primária, sendo que os gânglios trigêmeos são o sítio primário de infecções latentes por este vírus (Homan & Easterday, 1980; Narita et al., 1983; Van Engelenburg et al., 1995). Apesar de não estarem plenamente definidos os sítios preferenciais de latência do BoHV-5, o DNA deste pode ser encontrado consistentemente em gânglios trigêmeos de animais latentemente infectados (Meyer et al., 2001; Vogel et al., 2003). Assim, este foi o tecido escolhido para análise das infecções latentes neste estudo.

A padronização e a otimização das técnicas de PCR tiveram como objetivo a minimização de resultados falsos. Além disto, durante a execução dos testes, foram utilizadas áreas separadas para extração de DNA,

preparação do “mix”, execução da PCR, manipulação e análise dos produtos da PCR e nested PCR. Paralelamente e com o mesmo propósito, foram utilizados controles negativos a cada 05 amostras teste.

Em relação aos resultados falso-negativos, foi desenvolvido um CI da amplificação. A falta de amplificação do CI em amostras negativas para DNA de BoHV indicou que a ausência do fragmento alvo foi provavelmente devida a algum problema na reação (presença de inibidores da reação, por exemplo). Entretanto, uma parte destas amostras podem ser, em teoria, positivas. Por outro lado, a presença do CI na ausência do produto viral indicou que, ou o gânglio não continha DNA viral ou o número de cópias genômicas na amostra foi insuficiente para ser detectado por esta PCR.

Cabe salientar que controles de amplificação de PCR baseados em genes da espécie alvo como o gene ND5 presente no DNA mitocondrial bovino ou o gene do receptor do hormônio luteinizante bovino (bLHR) têm sido utilizados (Claus et al., 2005; Aoki, 2006). Entretanto, quando comparados ao CI descrito aqui, podem apresentar desvantagens; por exemplo, diferenças nas sequências de oligonucleotídeos usados e entre as sequências e tamanhos do produto alvo e controle podem levar a uma diferença na eficácia de amplificação muito grande entre os dois, comprometendo a interpretação dos resultados (Rosenstrauss et al., 1998).

Considerando-se a aplicação da PCR nas amostras dos 200 animais, na presença do CI, a percentagem de animais latentemente infectados com BoHV-1 e/ou BoHV-5 foi alta, 87,0 % (174/200) (Tab. 2). Apesar deste estudo não ter como objetivo determinar a prevalência destas infecções em

animais do RS, este resultado indica que ambos os vírus estão amplamente distribuídos na população bovina nesta região, como anteriormente demonstrado através de estudos soros-epidemiológicos (Poletto et al., 2004; Quincozes, 2005; Dias, 2006, Holz et al., *in press*). Possivelmente, supomos que se este fosse um estudo mais abrangente, com a coleta de um número mais representativo de amostras por município, a percentagem de animais positivos poderia ser semelhante ao aqui apresentado.

Vários trabalhos previamente publicados tiveram como objetivo a aplicação de PCR para identificar e diferenciar BoHV-1 e BoHV-5 em amostras clínicas (Ashbaugh et al., 1997; Ros et al., 1999; Alegre et al., 2001; Claus et al., 2005). Nestes trabalhos, diferentes alvos de amplificação foram utilizados e diferentes sensibilidades de detecção foram obtidas. Devido à conhecida presença de BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos no Brasil, e à ausência de testes sorológicos que diferenciem a resposta imune gerada por um e outro vírus, este tipo de trabalho se torna importante, pois ajuda a esclarecer a epidemiologia destas infecções virais.

Em Londrina, Paraná, Claus et al. (2005) desenvolveram uma multiplex PCR para detectar e diferenciar BoHV-1 e BoHV-5, também tendo o gene gC como alvo. A aplicação desta técnica em 17 amostras clínicas (5 amostras de fetos abortados, 5 de vacas com vulvovaginite e 7 amostras de cérebros de bovinos com meningoencefalites) gerou fragmentos de 354 pb para BoHV-1 e 159 pb para BoHV-5. Este teste foi capaz de detectar o DNA de BoHV em diluições contendo 5 e 50 TCID₅₀ das amostras Los Angeles (BoHV-1) e AA 01 (BoHV-5), respectivamente.

Todas as partículas de herpesvírus tem pelo menos uma molécula de genoma. Então, cada TCID₅₀ tem pelo menos uma molécula. Porém, nem todas as partículas virais são infecciosas. Com isto, todas as preparações virais possuem uma razão entre o número de partículas vivas e mortas. Entretanto, não há como fixar um valor, em geral, estima-se que existem entre 10 a 100 vezes mais moléculas do que partículas infecciosas (Van Engelenburg et al., 1993). Então, baseado neste conhecimento, estima-se que o número de moléculas presentes nas diluições (5 e 50 TCID₅₀) do trabalho de Claus et al. (2005) esteja entre 50 a 500 moléculas para BoHV-1 e 500 a 5000 para BoHV-5. Um limite de detecção muito além do utilizado neste trabalho, que variou entre 2,5 a 25 moléculas do DNA de BoHV-1 e BoHV-5 na presença de 200ng de DNA total de gânglio.

Silva M. et al. (2007), através do uso de uma PCR capaz de diferenciar BoHV-1 e BoHV-5, relatou a identificação de 40 amostras de herpesvírus isoladas de diferentes casos clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai entre 1987 e 2006. A PCR utilizada, que também teve como alvo um fragmento do gene gC, identificou 16 amostras de BoHV-1 e 24 de BoHV-5 isoladas de diferentes amostras clínicas. Apesar de não ser um estudo em que a PCR foi utilizada diretamente na identificação viral, este estudo, feito com um número maior de amostras comparado ao anterior, reforça a distribuição de ambos os agentes no Rio Grande do Sul.

A determinação da quantidade de DNA alvo amplificado é uma vantagem adicional do uso do CI, desde que este seja amplificado com a mesma eficiência que o DNA viral (Wang et al., 1989; Van Engelenburg et al.,

1993). Aqui, o uso do CI permitiu demonstrar pela primeira vez o número de genomas de BoHV (variando de aproximadamente 25 a 200 cópias em 5×10^4 células) em gânglios trigêmeos de animais naturalmente infectados. Comparativamente, isto é o que pode ser detectado na fase latente depois de uma infecção experimental com BoHV-1. Sob condições experimentais, algo em torno de 25 a 750 cópias de genoma de BoHV-1 pode ser encontrado em 5×10^4 células de gânglios trigêmeos de bovinos (Van Engelenburg et al., 1995).

Em *Herpesvírus humano tipo 3* (HHV-3 ou vírus da Varicela-zoster - VZV), membro do gênero *Varicellovirus*, o número de cópias encontradas nos gânglios trigêmeos pode ser muito baixo. Em um detalhado estudo realizado por Wang et al. (2005), utilizando micro-dissecação com laser de captura em gânglios trigêmeos de humanos foram encontradas em média 6,9 cópias de genomas de VZV por neurônio infectado. Entretanto, 20% dos neurônios tinham mais do que 100 cópias do genoma de VZV e um neurônio possuía 5.773 cópias do genoma de VZV. Isto demonstra que o genoma de varicelovírus não está distribuído de maneira homogênea em todos os neurônios de um gânglio e pode levar a resultados falso-negativos, dependendo da porção do gânglio estudada. Conseqüentemente, o percentual de 87 % de animais positivos encontrado neste estudo poderia ser mais elevado.

A utilização das duas nested PCRs tipo-específicas permitiu a discriminação entre as infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 pela primeira vez em estudos de prevalência destas infecções. Além disto, conduziu a uma descoberta inesperada, um número muito alto de co-infecções por BoHV-1 e

BoHV-5 (75,9 % dos animais positivos). Aliado a esta descoberta, a alta percentagem de animais positivos para BoHV-5 encontrada aqui (93,1 % dos animais positivos), corrobora com os estudos de Meyer et al. (2001) e Vogel et al. (2003) para estabelecer os gânglios trigêmeos como sítio preferencial de infecções latentes para o BoHV-5 .

Em estudo prévio, Aoki (2006) desenvolveu um teste de nested PCR fluorescente para o fragmento do gene timidina quinase (TK) que permitiu a detecção e discriminação entre BoHV-1 e BoHV-5 em 100 amostras de gânglios trigêmeos e leucócitos de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico. Foi possível identificar BoHV-1 por nested PCR fluorescente em 32 amostras de leucócitos e BoHV-1 e/ou BoHV-5 em 56 gânglios trigêmeos, o que foi confirmado posteriormente por sequenciamento. Destas 56 amostras, 45 foram positivos para BoHV-1 e 12 para BoHV-5, com a ocorrência de co-infecção em um gânglio, porém este achado não foi confirmado pelo sequenciamento.

A diferença entre os resultados do estudo de Aoki (2006) e os resultados aqui apresentados pode estar relacionada com a diferença de sensibilidade dos testes de PCR. Assim como Claus et al. (2005), a sensibilidade do estudo de Aoki (2006) foi baseada em TCID₅₀. Sendo o limiar de detecção em diluições seriadas de vírus em sangue livre de BoHV, entre 10² a 10⁻² TCID₅₀ / ml para BoHV-1 e de 10² a 10¹ TCID₅₀ / ml para BoHV-5. Logo, provavelmente uma percentagem dos resultados negativos de Aoki (2006) é na verdade de falso-negativos.

A identificação de ambos os vírus no SNC do mesmo animal já havia sido documentada por d'Offay et al. (1993). Além disto, Whetstone & Miller

(1989) demonstraram que após a inoculação experimental de duas amostras diferentes de alfa herpesvírus (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) há o estabelecimento de latência de ambos os vírus no mesmo tecido do animal portador. Muylkens et al. (2006) demonstraram o surgimento de vírus recombinantes virulentos após a co-infecção entre o vírus selvagem (BoHV-1) e o vacinal BoHV-1 gE⁻ *in vitro*. Também em experimentos *in vitro* de co-infecção com subtipos diferentes de BoHV-1 foi demonstrada uma tendência à recombinação entre os genomas, gerando variantes virais. Embora a homologia entre os genomas de BoHV-1 e BoHV-5 seja menor do que a encontrada entre subtipos de BoHV-1, a possibilidade de geração de recombinantes entre estes dois vírus nos animais co-infectados não pode ser excluída (Muylkens et al., 2009).

Os resultados do sequenciamento de alguns produtos amplificados na nested PCR mostraram que há pequenas diferenças encontradas entre as sequências dos produtos com perfil de BoHV-5 e as sequências disponíveis no GenBank. Isto auxilia na legitimação dos resultados, demonstrando que os produtos obtidos na nested PCR não são frutos de contaminação laboratorial. Já a homologia de 100% entre os produtos sequenciados de BoHV-1 e algumas sequências disponíveis no GenBank, pode estar relacionada com pequeno tamanho do fragmento (161 pb), ao contrário do fragmento de BoHV-5 (246 pb).

Infelizmente dados sobre a vacinação dos animais estudados são desconhecidos. Estes dados poderiam enriquecer o trabalho, pois é possível que uma parte dos animais sorologicamente positivos possua anticorpos vacinais, e não derivados de infecção. Mesmo assim, no presente estudo foi

observada uma grande diferença entre a soroprevalência e a prevalência de infecções latentes por PCR. Dos 200 animais utilizados neste estudo, 41,5 a 44,0 % apresentaram anticorpos neutralizantes contra BoHV, enquanto que, pelo menos 87 % dos animais foram positivos na PCR. Apesar da utilização da VN com 24 horas de incubação, tão sensível quanto os ELISAs de bloqueio (Perrin et al., 1993; Kramps et al., 1996; Kramps et al., 2004), é ainda possível que parte dos animais com anticorpos neutralizantes anti-BoHV não tenham sido detectados neste estudo. Estes dados são importantes porque mostram que testes de VN, apesar de serem amplamente utilizados no Brasil, não são precisos o suficiente para determinar a prevalência de infecções por estes vírus.

O uso de vacinas comerciais poderia ainda ter interferido nos resultados de detecção de DNA viral, pois há pelo menos uma vacina contra IBR utilizada no Brasil cujo vírus é capaz de estabelecer infecções latentes (Jones et al., 2000). Entretanto, mesmo que uma parte dos animais aqui estudados tenha sido vacinada, vacinas inativadas são mais comumente utilizadas por criadores de bovinos, e estas não poderiam interferir nos nossos resultados porque o vírus inativado não replica no hospedeiro e não pode estabelecer latência (Silva, L. et al., 2007).

Aoki (2006), no seu estudo sobre infecções latentes, também encontrou animais soronegativos no teste de ELISA e positivos no teste de PCR. Então é possível que nem todos os animais latentemente infectados possuam anticorpos (Ac) em níveis detectáveis nos testes utilizados. Por outro lado, Kaashoek et al. (1996b) realizou um estudo sobre a persistência de Ac

anti-BoHV-1 por dois a três anos depois da primo-infecção, demonstrando que é possível identificar altos títulos de anticorpos nestes animais ao final deste período. Os testes sorológicos utilizados neste estudo foram a VN com incubação de 24 horas e um ELISA de bloqueio contra a gB.

O presente estudo demonstra uma alta prevalência de infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em uma população de bovinos submetida ao abate no Rio Grande do Sul. Além disto, demonstra também, uma alta prevalência de co-infecções nestes animais. Por outro lado, o comércio internacional tem imposto barreiras sanitárias para limitar o trânsito de bovinos e sêmen infectados com herpesvírus bovinos. A forma de controlar/erradicar as infecções por estes vírus na população de bovinos é, em grande parte, dependente da prevalência da infecção viral. Enfim, os dados apresentados por este trabalho podem auxiliar a decidir qual método de controle a ser adotado, frente às infecções de bovinos por herpesvírus bovinos no Rio Grande do Sul.

6 – CONCLUSÕES

No presente trabalho uma PCR semi quantitativa foi desenvolvida para detectar o DNA de BoHV-1 e BoHV-5 em gânglios trigêmeos de 200 bovinos abatidos em um frigorífico no Rio Grande do Sul. Dentro do limite de detecção do teste foi encontrada uma quantidade variável de moléculas de DNA de BoHV, de algumas centenas a aproximadamente 25, presentes em 5×10^4 células de gânglios trigêmeos. Além disto, o DNA de BoHV foi detectado em pelo menos 87% da população estudada. No entanto, na VN, somente 41,5% a 44,0 % apresentaram anticorpos neutralizantes contra BoHV. Para diferenciar entre as infecções por BoHV-1 e BoHV-5, duas nested PCR tipo-específicas foram desenvolvidas utilizando a região amplificada da primeira PCR como molde. Os resultados destas nested PCR tipo-específica revelam que 82,8% dos bovinos positivos na primeira PCR estavam latentemente infectados com BoHV-1, 93,1% com BoHV-5 e 75,9% com ambos, BoHV-1 e BoHV-5.

7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta prevalência de co-infecções encontrada pela primeira vez em bovinos no Brasil indica a necessidade de melhor avaliar a extensão destas co-infecções em bovinos de outras regiões do Brasil. Como há controvérsias a respeito da proteção cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5, a presença disseminada de co-infecções poderia justificar o desenvolvimento e uso de vacinas que contém ambos os vírus.

Co-infecções por diferentes herpesvírus podem favorecer recombinações e o surgimento de variantes virais com diferentes potenciais patogênicos. Além disto, é possível que a presença do BoHV-1 e BoHV-5 na mesma célula latentemente infectada tenha efeitos não conhecidos sobre a manutenção ou reativação da infecção latente estabelecida pelos dois vírus. Estes aspectos poderiam ser explorados em trabalhos futuros de co-infecção viral *in vitro* e *in vivo*.

Por último, as diferenças nos resultados de sorologia e PCR nos leva a questionar a validade da VN na identificação de animais infectados e propor o desenvolvimento de métodos mais sensíveis na identificação destes animais.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOUR, H. A. & MOUSSA, A. Serological and virological studies on the infectious bovine rhinotracheitis in Algeria. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, Germany, v.43, n.4, p.251-256, 1996.

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.43, p.36-40, 1982.

ACKERMANN, M. & ENGELS, M. Pro and contra-IBR eradication. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.293-302, 2006.

AFONSO, D.A.F.; ORTEGA, L.S.; REDONDO, R.A.F.; TRINDADE, G.S.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Characterization of field bovine herpesvirus samples using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.140, p.200-205, 2007.

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Germany, v.48, n.8, p.613-21, 2001.

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

ANIMAL HEALTH AUSTRALIA. **Animal Health in Australia 2007**, Ed. Biotext, Canberra, Australia, 2008. Disponível on-line em: <http://www.animalhealthaustralia.com.au/aaahc/index.cfm?F220A69A-C79B-07C7-B0ED-56BE52309051>, acesso em 04 de janeiro de 2009.

ANTINONE, S.E.; SHUBEITA, G.T.; COLLER, K.E.; LEE, J.I.; HAVERLOCK-MOYNS, S.; GROSS, S.P.; SMITH, G.A. The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. **J. Virol.**, United States, v.80, p.5494-5498, 2006.

AOKI, S. M. **Desenvolvimento de novas metodologias para a identificação e caracterização genética de Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

2006. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 2006.

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

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

BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005.

BATAILLE, D. & EPSTEIN, A.L. Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. **J. Virol.**, United States, v.71, p.7736-7743, 1997.

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

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J. P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVENS, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Prev. Vet. Med.**, Netherlands, v.45, n.3-4, p.285-95, 2000.

BOOKER, C.W.; GUICHON, P.T.; JIM, G.K.; SCHUNICHT, O.C.; HARLAND, R.J.; MORLEY, P.S. Seroepidemiology of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. **Can. Vet. J.**, Canada, v.40, p.40-48, 1999.

BRATANICH, A.; SARDI, S.; SMITSAART, E.; ESTEVEZ-MADERO, J.; SCHUDEL, A.A. Comparison of 3 serological techniques for the diagnosis of BoHV-1 - serum neutralization, ELISA and indirect immunofluorescence. **Rev. Argent. Microbiol.**, Argentina, v. 22, n. 4, p. 192-198, 1990.

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

BULACH, D. M. & STUDDERT, M. J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Arch. Virol.**, Austria, v.113, n.1-2, p.17-34, 1990.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. High prevalence of coinfections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, accepted in Feb. 2009: VETMIC-D-08-3127.

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

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

CERQUEIRA, R.B.; CARMINATI, R.; SILVA, J.M.; CAMPOS, S.G.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, Brazil, v.37, n.6, 2000.

CHO, H.J. & BOHAC, J.G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Can. J. Comp. Med.**, Canada, v.49, n.2, p.189-94, 1985.

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

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

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.88, n.4, p.315-324, 2002.

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

DARCEL, C.Q. The prevalence of neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in cattle in Alberta. **Can. Vet. J.**, Canada, v.14, n.7, p.167-169, 1973.

DEBIASI, R.L. & TYLER, K.L. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. **Clin. Microbiol. Rev.**, United States, v.17, n.4, p.903-925, 2004.

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

DEKA RAMNEEK, D.; MAITI, N.K.; OBEROI, M.S. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Rev. - Off. Int. Epizoot.**, France, v.24, n.3, p.1085-1094, 2005.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.73-79, 2007.

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

DIAS, M.M. **Análise da soroprevalência do Herpesvírus bovino tipo 1 e do cortisol sérico em diferentes situações de manejo no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias – Virologia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

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

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

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

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

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

ENGELS, M. & ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.3-15, 1996.

ENQUIST, L.W.; TOMISHIMA, M.J.; GROSS, S.; SMITH, G.A. Directional spread of an α -herpesvirus in the nervous system. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.5-16, 2002.

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

FERREIRA, M.C.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino 1. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.3, p.363-372, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

GREGORY, T.R. 2005. **Animal Genome Size Database**. Disponível on-line em <http://www.genomesize.com>, acesso em 01/10/07.

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

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

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

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

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

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Prevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, aceito para publicação.

HOMAN, E.J. & EASTERDAY, B.C. Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.41, n.8, p.1212-1213, 1980.

HORIUCHI, M.; YAMAZAKI, N.; FURUOKA, H.; MATSUI, T.; NAKAGAWA, M.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. **J. Vet. Med. Sci.**, Japan, v.57, p.577-580, 1995.

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

ICTVDB MANAGEMENT. **00.031.1.02. Varicellovirus**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. v.4, 2006. Disponível on-line em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>, acesso 10 de dezembro de 2008.

JACOB, R.J.; MORSE, L.S.; ROIZMAN, B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. **J. Virol.**, United States, v.29, p.448-457, 1979.

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

JAIN, L. **Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection in breeding bulls by serological and molecular methods and its characterization by sequencing of PCR products**. Anand: College of Veterinary Science and Animal Husbandry Anand Agricultural University, 2006. 95 f. (Master of Veterinary Science – Microbiology) - Department of Veterinary Microbiology, College of Veterinary Science and Animal Husbandry Anand Agricultural University, Anand, 2006.

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

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

JONES, C. & CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Anim. Health Res. Rev.**, England, v.8, n.2, p.187-205, 2008.

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

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.103-110, 1996b.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, United States, v.171, n.10, p.1055-1064, 1977.

KAHRS, R.F. **Viral Diseases of Cattle**. Iowa: Published by Blackwell Publishing. 2001. p.324.

KAMPA, J.; STÅHL, K.; MORENO-LÓPEZ, J.; CHANLUN, A.; AIUMLAMAI, S.; ALENIUS, S. BVDV and BHV-1 Infections in Dairy Herds in Northern and Northeastern Thailand. **Acta Vet. Scand.**, England, v.45, p.181-192, 2004.

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

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

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

KRAMPS, J.A.; PERRIN, B.; EDWARDS, S.; VAN OIRSCHOT, J.T. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological

diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.153-161, 1996.

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

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

LATA, J.; KANANI, A.N.; PATEL, T.J.; PUROHIT, J.H.; JHALA, M.K.; CHUAHAN, H.C.; CHANDEL, B.S. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in indian breeding bulls of Gujarat. **Buffalo Bulletin**, Thailand, v.27, n.1, p.165-169, 2008.

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

LEMOES, R.A.A. **Enfermidades do Sistema Nervoso de Bovinos de Corte das regiões Centro-oeste e Sudeste do Brasil**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2005.

LI, Y.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L.A.; LIANG, X., Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **J. Virol.** United States, v.69, p.4758-4768, 1995.

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

LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. **Arch. Virol.**, Austria, v.145, n.10, p.2047-59, 2000.

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

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; FRANKEN, P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine**, Netherlands, v.19, n.15-16, p.1924-1930, 2001.

MCGEOCH, D.J.; DALRYMPLE, M.A.; DAVISON, A.J.; DOLAN, A.; FRAME, M.C.; MCNAB, D.; PERRY, L.J.; SCOTT, J.E.; TAYLOR, P. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. **J. Gen. Virol.**, England, v.69, n.7, p.1531-1574, 1988.

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

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. **J. Virol.**, United States, v.76, n.4, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, England, v.9, p.423-429, 2006.

METZLER, A.E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Arch. Virol.**, Austria, v.85, p.57-69, 1985.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease **Arch. Virol.**, Austria, v.87, n.3-4, p.205-217, 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.**, England, v.79, p.1983-1987, 1998.

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

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

MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.45, n.4, p.790-794, 1984.

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

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

MISRA, V.; BABIUK, L.A.; DARCEL, C.Q. Analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. **Arch. Virol.**, Austria, v.76, p.341-354, 1983.

MISRA, V.; WALKER, S.; HAYES, S.; O'HARE, P. The bovine Herpesvirus a gene *trans*-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its Herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. **J. Virol.**, United States, v.69, n.9, p.5209-5216, 1995.

MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; SCHYNTS, F.; KATALIN, F.; POURCHET, A.; THIRY, J.; VANDERPLASSCHEN, A.; ANTOINE, N.; THIRY, E. Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v. 113, p. 283-291, 2006.

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

MUYLKENS, B.; FARNIR, F.; MEURENS, F.; SCHYNTS, F.; VANDERPLASSCHEN, A.; GEORGES, M.; THIRY, E. Co-infection with two closely related alphaherpesviruses results in a highly diversified recombination mosaic displaying negative genetic interference. **J. Virol.**, United States, [Epub ahead of print], 2009.

MWEENE, A. S.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Jpn. J. Vet. Res.**, Japan, v.44, p.165-174, 1996.

NARITA, M.; INUI, S.; NAMBA, K.; SHIMIZU, Y. Neural changes in calves after intraconjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.39, p.1399-1403, 1978.

NARITA, M.; INUI, S.; NAMBA, K.; SHINIZU, Y. Detection of virus particles in trigeminal ganglion cells in a calf recurrently infected with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. **Nippon Juigaku Zasshi**, Japan, v.45, n.5, p.691-693, 1983.

OIE, World organization for animal health - **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals** - Part 2, section 2.3, chapter 2.3.5 - Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. 5th edition, 2004. Disponível on-line em http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/a_00056.htm, acesso 06/01/09.

OIE. **World animal health situation (2008)**. Disponível on-line em http://www.oie.int/eng/en_index.htm [World animal health situation > WAHID (>2004) > Disease information > Detailed country (ies) disease incidence], acesso em 04 de janeiro de 2009.

OKAZAKI, K.; HONDA, E.; KONO, Y. Heparin-binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. **Arch. Virol.**, Austria, v.134, n.3-4, p.413-419, 1994.

PASTORET, P.P.; AGUILAR-SETIEN, A.; BURTONBOY, G.; MAGER, J.; JETTEUR, P.; SCHOENAERS, F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.4, p.149-159, 1979.

PAYMENT, P.; ASSAF, R.; TRUDEL, M.; MAROIS, P. Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious bovine rhinotracheitis virus infection. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.10, n.5, p.633-636, 1979.

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

PERRIN, B.; BITSCH, V.; CORDIOLI, P.; EDWARDS, S.; ELOIT, M.; GUÉRIN, B.; LENIHAN, P.; PERRIN, M.; RØNSHOLT, L.; VAN OIRSCHOT, J.T. A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Rev. - Off. Int. Epizoot.**, France, v.12, n.3, p.969-984, 1993.

PETZOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; PRADO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.C.; WALD, V.B.; ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.38, n.4, p.184-187, 2001.

PIDONE, C.L.; GALOSI, C.M.; ECHEVERRIA, M.G.; NOSETTO, E.O.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Restriction Endonuclease Analysis of BHV-1 and BHV-5 Strains Isolated in Argentina. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Germany, v.46, n.7, p.453-456, 1999.

POLETTO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G.; Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos

leiteiros do município de Passo Fundo, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p. 595-598, 2004.

QUINCOZES, C.G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária – Virologia) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPEL, Pelotas, 2005.

RAJKHOWA, S.; RAJKHOWA, C.; RAHMAN, H.; BUJARBARUAH, K.M. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in mithun (*Bos frontalis*) in India. **Rev. - Off. Int. Epizoot.**, France, v.23, n.3, p.821-829, 2004.

REBHUN, W.C.; SMITH, J.S.; POST, J.E.; HOLDEN, H.R. An outbreak of the conjunctival form of infectious bovine rhinotracheitis. **Cornell Vet.**, United States, v.68, n.3, p.297-301, 1978.

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

REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, United States, v.27, p.493-497, 1938.

REYNOLDS, A.E.; LIANG, L.; BAINES, J.D. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. **J. Virol.**, United States, v.78, p.5564-5575, 2004.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M.S.; FLORES, E.F.; BARROS, C.S.L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.20, p.346-349, 2008.

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

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

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

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, Austria, v.123, n.3-4, 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, 2001. V. 1 and 2.

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

ROSENSTRAUS, M.; WANG, Z.; CHANG, S.; DEBONVILLE, D; SPADORO, J.P. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.36, n.1, p.191-197, 1998.

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

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of B-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, United States, v.230, p.1350-1354, 1985.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.A. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.18, n.2, p.75-82, 1998.

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

SAUSKER, E.A. & DYER, N.W. Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.14, p.68-70, 2002.

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

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

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

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

SCHWYZER, M. & ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminants. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, 1996.

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

SCHYNTS, F.; MCVOY, M.A.; MEURENS, F.; DETRY, B.; EPSTEIN, A.L.; THIRY, E. The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. **Virology**, United States, v.314, p.326-335, 2003.

SEVERINI, A.; SCRABA, D.G.; TYRRELL, D.L. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. **J. Virol.**, United States, v.70, p.3169-3175, 1996.

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

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

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.27, n.10, p.403-408, 2007.

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

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

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

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

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

STILWELL, G; MATOS, M.; CAROLINO, N. Seroprevalence of antibodies to four respiratory viruses in beef herds of the Ribatejo region of Portugal. **Rev. Port. Cien. Vet.**, Portugal, v.102, n.561-562, p.97-105, 2007.

STORCH, G.A. **Diagnostic Virology** in KNIPE, D. M. & HOWLEY, P.M. Fields Virology. 4th ed. By Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. Chapter 18, pp.411 and 418, two volumes.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Cienc. Agr.**, Londrina, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TAN, M.T.; YILDIRIM, Y.; EROL, N.; GÜNGÖR, A.B. The Seroprevalence of Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1) and Bovine Leukemia Virus (BLV) in Selected Dairy Cattle Herds in Aydin Province, Turkey. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, Turkey, v.30, p.353-357, 2006.

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

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

THIRY, E.; SALIKI, J.; BUBLOT, M.; PASTORET, P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.10, n.1, p.59-63, 1987.

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

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

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

VAN 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.**, United States, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.

VAN ENGELENBURG, F.A.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK F.A. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. **J. Gen. Virol.**, England, v.76, p.2387-2392, 1995.

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

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

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

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

VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; ALFAIA, B.T.; LINHARES, D.C.L. Anticorpos para o Herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciê. An. Bras.**, Goiás, v.4, n.2, p.131-137, 2003.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of Bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently experimentally infected calves. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.41, n.10, p.4512-4520, 2003.

VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MORAES, M.P.; BRAGANÇA, J.F.M. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.98, p.185-196, 2004.

WAGTER, L. H.; GLAS, R. D.; BLEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELENBURG, F. A.; RIJSEWIJK, F. A.; HOUWERS, D. J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine semen. **Vet. Res. Commun.**, Netherlands, v.20, n.4, p.401-408, 1996.

WANG, A.M.; DOYLE, M.V.; MARK, D.F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, United States, v.86, p.9717-9721, 1989.

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

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

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; SCHUCH, L. F.; REBELATTO, M. C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.4, n.3, p.341-343, 1992.

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

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

WINKLER, M. T.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. **J. Virol.**, United States, v.73, n.10, p.8657-8668, 1999.

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

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

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

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

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

9 – APÊNDICES

9.1 – Artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: High prevalence of co-infections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: Bovine herpesvirus; BoHV-1; BoHV-5; PCR; latency; prevalence; co-infection

Corresponding Author: MV Fabrício Souza Campos, M.Sc.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande do Sul

First Author: Fabrício S Campos, M.Sc.

Order of Authors: Fabrício S Campos, M.Sc.; Ana C Franco, Dr.; Silvia O Hübner, Dr.; Martha T Oliveira; Alessandra D Silva, Dr.; Paulo A Esteves, Dr.; Paulo M Roehe, Dr.; Franciscus A Rijsewijk, Dr.

Manuscript Region of Origin:

1 High prevalence of co-infections with *Bovine herpesvirus* 1 and 5 found in
2 cattle in southern Brazil

3 Campos, F.S.^{1*}, Franco, A.C.¹, Hübner, S.O.², Oliveira, M.T.¹, Silva, A.D.³, Esteves, P.A.³, Roehle, P.M.¹,
4 Rijsewijk, F.A.M.¹

5

6 1- Virology Laboratory, Microbiology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul
7 (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil & Institute for Veterinary
8 Research "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

9 2- Virology Laboratory, Department of Preventive Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of
10 Pelotas (UFPeL), Pelotas, University Campus, Post box 354, CEP 96010-900, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

11 3- Embrapa CNPSA, BR 153, Km 110, Concórdia, Post box 21, CEP: 89700-000, Santa Catarina (SC), Brazil.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

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

26

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

31 **Abstract**

32 Based on small scale studies or on little sensitive serological tests, bovines in the South of the state of Rio
33 Grande do Sul, Brazil, are known to be infected with either *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) or 5 (BoHV-5).
34 However, whether the prevalence of each of these viruses is high or low is currently still unknown. In order
35 to determine the extent of BoHV (-1 and/or -5) infections in bovines in this region of Brazil, 200 bovines
36 were studied for presence of latent BoHV DNA. To this end, first a quantitative PCR was developed that
37 amplified BoHV-1 DNA as well as BoHV-5 DNA. Using this PCR the number of BoHV genomes
38 normally present in latently infected ganglia of naturally infected bovines was estimated. It was found that
39 the new PCR was sensitive enough to detect most BoHV DNA in infected ganglia. The results of this first
40 PCR showed that at least 87% of the bovines in the South of Rio Grande do Sul are latently infected with
41 either BoHV-1 or BoHV-5. To determine the prevalence of BoHV-1 and BoHV-5 separately, two type-
42 specific PCRs -one for each virus- were developed that used the products of the first PCR as a template.
43 The results of these type-specific PCRs showed that 82.8% of the BoHV positive population was latently
44 infected with BoHV-1, 93.1% with BoHV-5 and 75.9% with both BoHV-1 and BoHV-5. This is the first
45 time that such a high frequency of co-infection of BoHV-1 and BoHV-5 in bovines has been demonstrated.

46

47 **Keywords:**48 *Bovine herpesvirus*; BoHV-1; BoHV-5; PCR; latency; prevalence; co-infection.

49

50 **Introduction**

51 *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) is a member of the order of *Herpesvirales*, the family *Herpesviridae*, the
52 subfamily *Alphaherpesvirinae* and the genus *Varicellovirus* (McGeoch et al., 2006). BoHV-1 is an
53 important pathogen of cattle causing economic losses worldwide. BoHV-1 is mainly implicated in
54 respiratory infection (infectious bovine rhinotracheitis, IBR), genital disease (vulvovaginitis/pustular
55 balanoposthitis, IPV/IBP) and abortion (Kahrs, 2001). Sporadically, BoHV-1 is associated with
56 encephalitis (Roels et al., 2000; Silva et al., 2007a).

57 BoHV-1 infections go through three phases: a primary infection that lasts about two weeks, followed by a
58 lifelong latent infection, occasionally followed by reactivation of latent virus that causes renewed virus
59 shedding for several days (For a recent review on BoHV-1 see Muylkens et al., 2007). Reactivation and re-
60 excretion of BoHV-1 is mainly depending on the health conditions of the host. Among the tissues where
61 BoHV-1 virus remains latent are the sensory ganglia of the nerves that innervate the sites of the primary
62 infection. These tissues are, for example, the lumbo-sacral ganglia after a genital infection (Van
63 Engelenburg et al., 1995a) and the trigeminal ganglia after a respiratory infection (Van Engelenburg et al.,
64 1995b). In those tissues viral DNA remains in the nuclei of neuronal cells (Muylkens et al., 2007). In
65 practice, animals that have a genital BoHV-1 infection also develop a BoHV-1 respiratory infection due to
66 animal-to-animal transmission (Mollema et al., 2006). This makes trigeminal ganglia a preferred site to
67 detect genomic DNA of latent BoHV-1.

68 On the other hand, the closely related *bovine herpesvirus 5* (BoHV-5), which has about 70% sequence
69 identity with BoHV-1 (Delhon et al., 2005) is implicated in bovine encephalitis or meningoencephalitis,
70 although sometimes the virus has also been recovered from both genital and respiratory tracts of cattle
71 (Bratanich et al., 1991). Unlike BoHV-1, which is usually associated with low mortality rates, BoHV-5
72 meningoencephalitis is highly fatal, with mortality rates approaching 100% if it concerns bovines under 1
73 year of age (Salvador et al., 1998). BoHV-5 does not have a worldwide distribution, but is predominantly
74 found in Australia and South America.

75 The state Rio Grande do Sul has a cattle population of 14 million (IBGE, 2007) that for the biggest part is
76 roaming free in the fields and a large part of this population is found in the South of this state. Based on
77 several small scaled studies (Silva et al., 2007b; Rissi et al., 2008) and serological studies, which have little

78 sensitivity and can not discriminate between BoHV-1 and BoHV-5 antibodies (Roche et al., 1997; Holz et
79 al., *in press*), it can be inferred that part of this cattle population is infected with BoHV-1 or BoHV-5.
80 To study the prevalence of BoHV-1 and BoHV-5 in bovines in the South of Rio Grande do Sul in a more
81 resolute way, it was decided to try to detect latent viral DNA in their trigeminal ganglia. To this end a
82 quantitative PCR was developed that allowed the amplification of both BoHV-1 and BoHV-5 genomic
83 DNA. The quantitative PCR was sensitive enough to detect most BoHV DNA infected trigeminal ganglia
84 and showed that at least 87% of the studied bovines were positive for BoHV. To discriminate between
85 BoHV-1 and BoHV-5 infected animals, two type-specific PCRs were developed - one for each virus - that
86 used the products of the first PCR as a template. It was found that the majority of the BoHV infected
87 animals are infected with both BoHV-1 and BoHV-5.
88

89 **Materials and methods**

90 *Cells and viruses*

91 Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, subcultured from ATCC CCL-22, were used to multiply
92 BoHV-1 and BoHV-5 viruses. The cells were kept in Eagle's minimal essential medium (EMEM, Gibco)
93 with 10% fetal bovine serum (SFB, Cultilab) supplemented with a cocktail of antibiotics [10 IU/ml
94 penicillin (Cultilab), 10 µg/ml streptomycin (Cultilab) and 2 µg/ml amphotericin B (Cristália)]. The BoHV-
95 5 strain used in this study is EVI 88/95 and the BoHV-1 strain is EVI 123/98. Both strains were isolated in
96 Rio Grande do Sul in, respectively, 1995 and 1998 (Roehe et al., 1997; D'Arce et al., 2002).

97

98 *Collection of trigeminal ganglia and sera*

99 Both the left and the right trigeminal ganglion of 200 cattle of mixed breeds, both male and female, with a
100 mean age of about 4 years and originating from 40 cities spread over the South of Rio Grande do Sul, were
101 collected in a slaughterhouse in Pelotas in the far South of Rio Grande do Sul. In short, the heads of the
102 animals just slaughtered were randomly chosen and opened with an electric saw to take out the brains.
103 Subsequently, the trigeminal ganglia were collected in pairs using sterilized pincers, scissors and
104 surgical knives. The ganglia were stored individually in six well plates, placed on dry ice and
105 transported. In the laboratory the ganglia were cut into several pieces and each piece was placed in a
106 separate well of a 24 well plate and frozen at -70 °C until processed.

107 From all 200 heads 10 ml blood samples were collected and after coagulation the blood samples were
108 centrifuged for 10 min at 3000 rpm (Damon/IEC Divison) to obtain the serum fraction of each sample.
109 These samples were stored in 1.5 ml microtubes at -20 °C until further use.

110

111 *Virus neutralization tests*

112 Virus neutralization tests using BoHV-1 and BoHV-5 were performed essentially as described previously
113 by Teixeira et al. (1998). In short, 50 µl of each serum were mixed with 50 µl of a virus sample containing
114 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose). This test was performed with BoHV-1 (EVI 123/98) as
115 well as with BoHV-5 (EVI 88/95). After 1h pre-incubation at 37 °C, 50 µl of a cell suspension were added
116 to the pre-incubation mixture at a concentration of 3 x10⁴ cells per well of a 96 well plate and the plates

117 were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Four days after the start of the test the plates were
118 examined for the presence of the characteristic cytopathic effect of BoHV. The titers were calculated using
119 the method of Reed and Muench (1938).

120

121 *Extraction of total ganglion DNA*

122 Fragments of trigeminal ganglia of about 50 µg were placed in 1 ml lysis buffer [20 mM Tris-HCl
123 (Invitrogen), pH 7.4; 10 mM EDTA (Invitrogen), pH 8.0 and 200 mM NaCl₂ (Nuclear); 100 µg proteinase K
124 (USB Corporation) and 1% SDS (Promega)] and incubated over-night at 37 °C. After this, the mixture was
125 centrifuged at 12.000 g for 10 min to precipitate the non-digested material and 400 µl supernatant was
126 collected. After a standard phenol (Invitrogen) extraction and ethanol (Pro Analysis) precipitation
127 (Sambrook and Russell, 2001) the purified DNA was dissolved in 200 µl TE (10 mM Tris pH 7.4; 1 mM
128 EDTA pH 8.0). To check for the quantity and quality of the obtained DNA, 10 µl were analyzed on an
129 agarose (Invitrogen) gel and compared with known quantities of phage lambda DNA (Fermentas). It has
130 been established using predetermined amounts of internal control templates that the amount of total
131 ganglion DNA that still allowed an efficient PCR amplification was 200 ng.

132

133 *The first PCR reaction to detect BoHV-1/BoHV-5 simultaneously*

134 The primers used in the first PCR assay were based on the glycoprotein C (gC) coding sequences of both
135 BoHV-1 and BoHV-5, which were available in the database of the National Center for Biotechnology
136 Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers (PF2: 5' CGGCCACGACGCTGACGA 3'
137 and PR1: 5' CGCCGCCGAGTACTACCC 3') anneal to a region shared by both BoHV-1 and BoHV-5 and
138 amplify a region of 575 and 572 bp, respectively (Esteves et al., 2008). To be able to detect the low number
139 of BoHV genomes present in ganglia, it was needed to optimize the PCR developed by Esteves et al.
140 (2008). The improved PCR reaction (25 µl) contained 1 mM MgCl₂ (Invitrogen) 0.3 µM of each primer
141 (IDT), 10% dimethylsulfoxide (DMSO; Acros Organics), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10% of
142 PCR buffer (Invitrogen) and 0.6 mM deoxynucleoside triphosphates (ABgene) per reaction. To each
143 reaction, 25 molecules of the internal control template (product length 440 bp) were added to detect false
144 negative reactions. Reactions were performed in the Eppendorf Mastercycler under the following cycle

145 conditions: 5 min at 94 °C; followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 62 °C, 1 min at 72 °C;
146 followed by 5 min at 72 °C.

147 To avoid contaminations with PCR products, separate spaces were used to prepare the PCR reaction buffer,
148 the extraction of total ganglion DNA, and the analysis of the PCR products. Moreover, filter tips were
149 used, work benches were decontaminated with UV light, and negative controls were included in each five
150 PCR reactions.

151

152 *The second and third PCR reactions to detect BoHV-1 and BoHV-5 separately*

153 To differentiate between BoHV-1 and BoHV-5, two subtype-specific PCRs were performed using the
154 product of the first PCR as a template. To detect BoHV-1 DNA the primer pair (PF 5'-
155 CTAACATGGAGCGCCGCTT-3' and PR 5'-CGGGGCGATGCCGTC-3') was used, which gives a
156 product of 161 bp. To detect BoHV-5 the primer pair (PF 5'-GTGGAGCGCCGCTTCGC-3' and PR 5'-
157 TATCGCGGAGAGCAGGCG-3') was used, which gives a product of 236 bp. Each PCR reaction was
158 carried out in a total volume of 25 µl containing 1 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer forward, 10% DMSO
159 (Acros Organics), 0.6 mM dNTPs (ABgene), 1x buffer and 1U of *Taq* polymerase (Invitrogen). The
160 cycling conditions were: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min 94 °C, 1 min 61 °C and 1 min 72
161 °C and a final extension time of 5 min 72 °C.

162

163 **Results**

164 *BoHV virus neutralization tests (VNTs)*

165 To know what the prevalence of BoHV infected bovines would be when a standard VNT was used, all 200
166 bovines used in this study were also tested serologically. The results of the VNTs to detect neutralizing
167 antibodies to either BoHV-1 or BoHV-5 revealed an overall antibody prevalence of 31.5 % (26.0% to
168 BoHV-1; 22.0% to BoHV-5), of which most (77%) reacted to both virus types (Table 1).

169

170 *Construction of an internal control molecule for the BoHV PCR*

171 To be confident that genomic BoHV DNA could be amplified in the presence of isolated ganglion DNA, an
172 internal control molecule was constructed that could be amplified by the same primers as the BoHV viral
173 DNA and was added to each PCR reaction. To differentiate between the viral product and the internal
174 control product the amplified region of the internal control construct was made 135 bp shorter than the viral
175 product (575/572 bp). To this end a plasmid containing the viral PCR product of BoHV-1 (EVI 123/98)
176 was digested with *BsmBI*, separated from its 135 bp *BsmBI* insert and recircularized (Fig.1a). The resulting
177 construct, named internal control (IC) was added to the PCR reactions and gave rise to a 440 bp fragment.
178 The presence of the IC product in the absence of a viral product implied a negative result, at least a result
179 below the detection limit of the method. On the other hand, the absence of both a viral product and an IC
180 product implied an amplification failure and could be a false negative result. Ganglion DNA samples that
181 even after several attempts failed to allow the amplification of the IC were considered non-interpretable,
182 which corresponded to about 2.5% of the samples.

183

184 *Sensitivity of the BoHV PCR*

185 The sensitivity of the BoHV PCR was determined using ten fold serial dilutions of known quantities of IC
186 molecules. Moreover, the co-amplification of both viral DNA and IC DNA was established to check for
187 any major difference DNA in amplification efficiency. The products of 25 molecules of IC and viral
188 template were still easily visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel (Fig. 1b). This implies that
189 the lower detection limit of this PCR experiment is positioned between 25 and 2.5 molecules. Because in
190 practice the PCR is performed using 200 ng of total ganglion DNA, the sensitivity test was also done in the
191 presence of 200 ng total ganglion DNA from a BoHV positive cow (Fig. 1c). 200 ng genomic bovine DNA

192 is the amount found in 5×10^4 bovine cells. This experiment showed that also in the presence of 200 ng
193 total ganglion DNA, 25 molecules of IC gave an easily detectable band on an agarose gel (Fig.1c, lane 4).
194 The absence of a visible viral band in the presence of 2500 IC molecules (Fig.1c, lane 1) is due to
195 competition between both templates.

196

197 *Quantification of mean number BoHV genome copies in trigeminal ganglia*

198 The presence of a known number of internal control molecules in the PCR reaction made it possible to
199 estimate the mean number of BoHV genomes present in a portion of a latently infected ganglion. The IC
200 fragment is amplified with the same efficiency as the viral DNA fragment (see Figures.1b and 1c, lanes 4).
201 Therefore, when the intensities of the bands of the PCR products of both the IC fragment and the viral
202 fragment are the same, the amount of viral genomes found in 200 ng of total DNA is about 25 molecules.
203 Using these co-amplification results it was estimated that in 5×10^4 trigeminal ganglion cells up to some
204 200 BoHV genomes could be detected, like in Fig. 2a, lane 7. On the other hand, often only a few BoHV
205 genome copies are detected in 5×10^4 trigeminal ganglion cells (Fig. 2a, lane 2 and Fig. 2b). This implied
206 that some (parts of) ganglia may harbor even less BoHV genome copies than the detection limit of our test
207 and will not score positive.

208

209 *Percentage of bovines that scored positive for the presence of BoHV genomes in their trigeminal ganglia*

210 The results of the first BoHV PCR test used in this study showed that of the 400 ganglia tested, 74.8%
211 (299/400) scored positive, 20.5% (82/400) scored negative and 4.7% (19/400) gave a non-interpretable
212 result (Table 2). In some cases only one of both ganglia scored positive, underscoring the non-
213 homogeneous distribution of trigeminal ganglia cells positive for BoHV genomes. As a consequence, the
214 percentage of animals that scored positive for the presence of BoHV genomes in (only one of) their
215 trigeminal ganglia was higher: 87.0% (174/200) scored positive, 10.5% (21/200) scored negative and 2.5%
216 (5/200) were non-interpretable (Table 2).

217

218 *Type-specific PCRs for BoHV-1 and BoHV-5 that used the products of the BoHV PCR as a template*

219 Within the amplified region of the BoHV PCR, two pairs of primers were selected that were specific for
220 BoHV-1 and for BoHV-5, respectively. Using the products of the first PCR as templates the primers pairs

221 gave products of 161 bp for BoHV-1 and 236 bp for BoHV-5 (Fig.3). All 299 BoHV templates gave rise to
222 a product in at least one of the type-specific PCRs. In many cases the products of the first PCR gave a
223 positive result in both type specific PCRs (Fig.3).

224

225 *High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5*

226 Application of both type-specific PCRs to all the first PCR products of the 174 BoHV positive animals
227 showed that 82.8% (144/174) of them was positive for BoHV-1, 93.1% (162/174) for BoHV-5 and 75.9%
228 (132/174) for both BoHV-1 and BoHV-5 (Table 2).

229

230 Discussion

231 The identification of herpesvirus infected animals based on the presence of genomic DNA of latent virus
232 has to our knowledge never been performed on such a large scale as in this study. The high number of
233 samples is in support of the reliability of the obtained results. Of the 200 animals used here 22% to 26%
234 were found positive for BoHV in standard VNTs, while at least 87% of them scored positive for BoHV in
235 the PCR assay. All VNT BoHV positive animals also tested positive in the BoHV PCR and none of the
236 PCR negative animals tested positive in the VNTs. The difference between the serological results and the
237 PCR indicate that the PCR test is much more reliable. Moreover, the used VNTs could not discriminate
238 between BoHV-1 and BoHV-5 infections. The PCR results of this study reflect the results of a study
239 concerning *Canine herpesvirus* (CHV) infections in dogs performed by Burr et al. (1996). These authors
240 found 75% (9/12) of the studied dogs positive in a PCR assay, while none of them was serologically
241 positive for CHV. Burr et al. (1996) also showed that lumbo-sacral ganglia and tonsils were among the
242 most commonly latently infected tissues. This may be the case for CHV in dogs, but it may be different for
243 BoHV-1 in cattle. After an intranasal infection with BoHV-1, latent BoHV-1 can occasionally be detected
244 in tonsils and lymph nodes close to the site of infection, in the trigeminal ganglia BoHV-1 DNA is
245 persistently detected (Van Engelenburg et al., 1995b).

246 This study also shows for the first time the number of BoHV genomes (from only a few copies to 200 in $5 \times$
247 10^4 cells) that can be found in trigeminal ganglia after a natural BoHV infection of cattle with a mean age
248 of about four years. This is less than can be detected in the latent phase after an experimental infection with
249 BoHV-1. Under experimental conditions some 25 to 750 BoHV genomes can be found in 5×10^4
250 trigeminal ganglion cells (Van Engelenburg et al., 1995b). In comparison with another member of the
251 genus *Varicellovirus*, *Varicella zoster virus* (VZV) such numbers are quite low. In a detailed study by
252 Wang et al. (2005) using Laser-Capture Micro-dissection; it was found that in a human trigeminal ganglion
253 the mean number of VZV copies per infected neuron was 6,9. However, 20% of the neurons had more than
254 100 VZV copies and one neuron even had 5,773 VZV copies. This shows that latent varicellovirus
255 genomes are not homogeneously divided over the trigeminal ganglion and this may lead to a false negative
256 result using a negative sample of an otherwise positive ganglion. The detected number of 87% BoHV
257 positive animals in this study may therefore be higher. Another source of uncertainty are the non-

258 interpretable results, part of these samples may be BoHV positive as well. Altogether, at least 87% of the
259 200 tested animals are BoHV positive.

260 The use of the amplified region of the first PCR in two sub-type specific PCRs allowed the discrimination
261 between BoHV-1 and BoHV-5 latent infections and led to the unexpected discovery of a very high number
262 of BoHV-1 and BoHV-5 co-infected trigeminal ganglia. The available data about the preferred sites for
263 latent BoHV virus are mainly based on studies concerning BoHV-1. Whether BoHV-5 is also preferentially
264 found latent in trigeminal ganglia is not well documented and also the number of BoHV-5 genomes that are
265 present in these ganglia during the latent phase is not known. The high percentage of BoHV-5 positive
266 animals, however, suggests that latent copy numbers and latent sites for BoHV-5 are not very different
267 from BoHV-1.

268 BoHV infected cattle and semen are confronted more and more with international trade limitations. The
269 approach to control BoHV infections in a cattle population are to a great extent dependent on the
270 prevalence of the viral infection. With a low number of infected animals the 'stamping out' method is
271 preferred, while with a high number of infected animals vaccination with a marker vaccine followed by
272 selective slaughter is favored (Ackermann & Engels, 2006). The data presented here will help to decide
273 how to face the BoHV infections of cattle in the South of Rio Grande do Sul.

274

275 **Conclusions**

276 A quantitative PCR has been developed to detect both BoHV-1 and BoHV-5 DNA in trigeminal ganglia of
277 cattle. The PCR method had a detection limit between 2.5 and 25 molecules of BoHV DNA. Using this
278 PCR it was found that the number of BoHV DNA molecules present in 5×10^4 ganglion cells ranged from
279 several hundreds to only a few. Within the detection limits of the newly developed PCR, BoHV DNA could
280 be detected in at least 87% of the bovines in South of Rio Grande do Sul, Brazil. To differentiate between
281 BoHV-1 and BoHV-5 infections two subtype-specific PCRs were developed using the amplified region of
282 the first PCR as a template. The results of the sub-type specific PCRs implied that 82.8% of the BoHV
283 positive bovines were latently infected with BoHV-1, 93.1% with BoHV-5 and 75.9% with both BoHV-1
284 and -5.
285

286 **Acknowledgments**

287 The authors like to thank the functionaries of the slaughterhouse of Pelotas for their hospitality and
288 cooperation and the National Counsel of Technological and Scientific Development for financial support.

289 The authors are also thankful to Prof. Ana Paula Guedes Frazzon for her help with a pre-PCR room and
290 also to the functionaries, professors and colleagues of the Virology Laboratories of UFRGS, UFPel and

291 IPVDF.

292

293 **References**

294

295 Ackermann, M., Engels, M., 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 113, 293-302.

296

297 Bratanich, A.C., Sardi, S.I., Smitsaart, E.N., Schudel, A.A., 1991. Comparative studies of BHV-1 variants
298 by in vivo-in vitro tests. *J. Vet. Med. B.* 38, 41-48.

299

300 Burr, P.D., Campbell, M.E., Nicolson, L., Onions, D.E., 1996. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide
301 range of tissues using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 53, 227-237.302 D'Arce, R.C.F., Almeida, R.S., Silva, T.C., Franco, A.C., Spilki, F., Roehe P.M., Arns, C.W., 2002.
303 Restriction endonuclease and monoclonal antibody characterization of Brazilian isolates of bovine
304 herpesviruses types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88, 315-324.305 Delhon, G., Moraes, M. P., Lu, Z., Afonso, C. L., Flores, E. F., Weiblen, R., Kutish, G. F., Rock, D. L.,
306 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77, 10339-47.

307

308 Esteves, P.A., Dellagostin, O.A., Pinto, L.S., Silva, A.D., Spilki, F. R., Ciacci-Zanella, J.R., Hübner, S.O.,
309 Puentes, R., Maisonnave, J., Franco, A.C., Rijsewijk, F.A.M., Batista, H.B.C.R., Teixeira, T.F., Dezen, D.,
310 Oliveira, A.P., David, C., Arns, C.W., Roehe, P.M., 2008. Phylogenetic comparison of the carboxy-
311 terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America
312 (SA). *Virus Res.* 131, 16-22.

313

314 Holz, C.L., Cibulski, S.P., Teixeira, T.F., Batista, H.B.C.R., Campos, F.S., Silva, J.R., Varela, A.P.M.,
315 Cenci, A., Franco, A.C., Roehe, P.M., 2009. Prevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado
316 do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* *in press.*

317

318 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Pesquisa Pecuária Municipal (www.ibge.gov.br)
319 [Download>Estatística>

320 Producao_Pecuaria>Producao_da_Pecuaria_Municipal_[anual]>2007>03ufs>tab01> rs].

321

322 Kahrs RF, ed.: 2001, Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: Viral
323 diseases of cattle, pp. 159–170. Iowa State University Press, Ames, IA.

324

325 McGeoch, D.J., Rixon, F.J., Davison, A.J., 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.*
326 117, 90-104.

327

328 Mollema, L., Koene, P., de Jong M.C., 2006. Quantification of the contact structure in a feral cattle
329 population and its hypothetical effect on the transmission of bovine herpesvirus 1. *Prev. Vet. Med.* 77, 161-
330 179.

331

332 Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E., 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and
333 infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38, 181-209.

334

335 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) => <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

336

337 Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* 27,
338 493–497.

339

340 Rissi, D.R., Pierezan, F., Sá e Silva, M., Flores E.F., Lombardo de Barros, C.S. 2008. Neurological disease
341 in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diag. Invest.* 20, 346-349.

342

343 Roehe, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, D.G., Rosa J.C.A., 1997. Diferenciação entre o vírus da
344 rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). *Pesq. Vet. Bras.* 17,
345 41-44.

346

347 Roels, S., Charlier, G., Letellier, C., Meyer, G., Schynts, F., Kerkhofs, P., Thiry, E., Vanopdenbosch, L.,
348 2000. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.* 146, 586-588.

349

- 350 Salvador, S.W.C., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Roehe, P.M., Osorio, A.L.A.R., 1998.
351 Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo.
352 *Pesq. Vet. Bras.* 18, 76-83.
353
- 354 Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor,
355 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
356
- 357 Silva, M.S., Brum, M.C.S., Loreto, E.L.S., Weiblen R., Flores, E.F, 2007a. Molecular and antigenic
358 characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with
359 neurological disease. *Virus Res.* 129, 191-199.
360
- 361 Silva, M.S., Brum, M.C.S., Weiblen, R., Flores, E.F., 2007b. Identificação e diferenciação de herpesvírus
362 bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006).
363 *Pesq. Vet. Bras.* 27, 403-408.
364
- 365 Teixeira, M.B., Esteves, P.A., Coelho, C.S.S., Silva, T.C., Oliveira, L.G., Roehe, P.M., 1998. Diferenças
366 em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes
367 de soroneutralização. *Pesq. Vet. Gau.* 4, 61-65.
368
- 369 Van Engelenburg, F.A., Van Schie, F.W., Rijsewijk, F.A., Van Oirschot, J.T., 1995a. Excretion of bovine
370 herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 33, 308-
371 312.
372
- 373 Van Engelenburg, F.A., Kaashoek, M.J., van Oirschot, J.T., Rijsewijk F.A., 1995b. A glycoprotein E
374 deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type
375 virus, but for a shorter period. *J. Gen. Virol.* 76, 2387-2392.
376

- 377 Wang, K., Lau, T. Y., Morales, M., Mont, E.K., Straus, S.E., 2005. Laser-Capture Microdissection:
378 Refining Estimates of the Quantity and Distribution of Latent Herpes Simplex Virus 1 and Varicella-Zoster
379 Virus DNA in Human Trigeminal Ganglia at the Single-Cell Level. *J. Virol.* 79, 14079–14087.
380

381 **Table 1.** Results of virus neutralization test for BoHV-1 and BoHV-5.
 382

Serum	BoHV-1 ^a		BoHV-5 ^b		BoHV-1 ^a /BoHV-5 ^b	
	Number	%	Number	%	Number	%
Positives	52	26.0	45	22.0	63	31.5
Negatives	148	74.0	155	78.0	137	68.5
Total	200	100	200	100	200	100

383
 384
 385
 386

^a BoHV-1: strain EVI 123/98.

^b BoHV-5: strain EVI 88/95.

387 **Table 2.** PCR results per trigeminal ganglion and per animal.
 388

		BoHV PCR				BoHV-1 and BoHV-5 specific PCRs			
		Total	BoHV Positives	BoHV Negatives	Inhibited ^a	Total	BoHV-1	BoHV-5	BoHV-1 and -5
Results per ganglion	Number	400	299 ^b	82	19	299 ^b	38	69	192
	%	100	74.8	20.5	4.7	100	12.7	23.1	64.2
Results per animal	Number	200	174 ^c	21	5	174 ^c	12	30	132
	%	100	87.0	10.5	2.5	100	6.9	17.2	75.9 ^d

389 ^a In the samples that were inhibited neither the viral product nor the product of the 25 molecules of the internal control
 390 could be detected.

391 ^{b, c} The subtype specific PCRs were accomplished using in the products of the BoHV positive samples.

392 ^d The percentage of BoHV-1 and -5 positive animals is based on the number of BoHV positive animals. In the total
 393 population of 200 animals the percentage of BoHV-1 and -5 co-infections is 66%.
 394

395 Figure 1a. Construction of an internal control molecule. The left hand diagram (I) represents the
396 prokaryotic plasmid pCR II - TOPO in which the complete 575 bp PCR product of BoHV-1 has been
397 cloned and this construct is named wild type (WT). The forward primer (PF2) and the reverse primer (PR1)
398 are shown as arrows. Moreover, the restriction enzyme recognitions sites for *BsmBI* are indicated. The right
399 hand diagram (II) represents the internal control (IC) construct that has been obtained by removal of the
400 135 bp *BsmBI* fragment from the WT construct. The size of the PCR product of the IC template using the
401 same PF2 and PR1 primers as for WT template is 440 bp.

402

403 Figure 1b. Co-amplification of the WT construct (I) with IC construct (II). Estimated equal numbers of both
404 WT molecules and IC molecules were mixed. A 10-fold dilution series of this mixture was amplified by
405 PCR, and 5 µl of the PCR reaction mixture (25 µl) were analyzed by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel.
406 The total number of molecules added to the reaction was 2500 (lane 2), 250 (lane 3), 25 (lane 4) and 2.5
407 (lane 5). Lane 1: negative control; lane 6: 100 bp DNA Ladder (BioLabs).

408

409 Figure 1c. Co-amplification of target viral DNA with the IC molecules in the presence of total DNA
410 extracted from a bovine trigeminal ganglion. 200 ng of total DNA was mixed with tenfold dilutions of IC
411 molecules and submitted to the BoHV PCR. 5 µl of the PCR products were analyzed by electrophoresis in a
412 1.5 % agarose gel. Total numbers of copies of IC molecules were 2500 (lane 1), 250 (lane 3), 25 (lane 4)
413 and 2.5 (lane 5). Negative controls (lanes 2 and 6) and Lambda x *HindIII* marker (lane 7).

414

415 Figure 2a. Estimation of the number of BoHV genomes copies in trigeminal ganglia. 200 ng of total
416 trigeminal ganglion DNA was mixed with 25 copies of the IC template and amplified. 10 μ l of the PCR
417 reaction volume of 25 μ l were analyzed on a 1.5 % agarose gel. Lane M: 100 bp DNA Ladder (BioLabs);
418 lane 1: a BoHV negative sample; lanes 2, 3, 5, 6 and 7: BoHV positive samples. Lane 4: negative control.
419

420 Figure 2b. Graphical presentation of the estimated numbers of BoHV genomes present in the 5×10^4 cells of
421 trigeminal ganglia based on Fig 2a.
422

423 Figure 3. Co-infection of BoHV-1 and BoHV-5. The PCR products of three BoHV positive trigeminal
424 ganglia (TG) were analyzed by both type-specific PCRs. 6 μ l of the PCR reaction volume of 25 μ l were
425 separated on a 1.5 % agarose gel. All three samples gave rise to both the 161 bp product of the BoHV-1
426 specific PCR and the 236 bp product of the BoHV-5 specific PCR. Lane 1: 100 bp DNA Ladder (BioLabs),
427 lanes 2 and 6: TG277, lanes 3 and 7: TG258, lanes 4 and 8: TG255, lane 5: negative control.

Figure 1

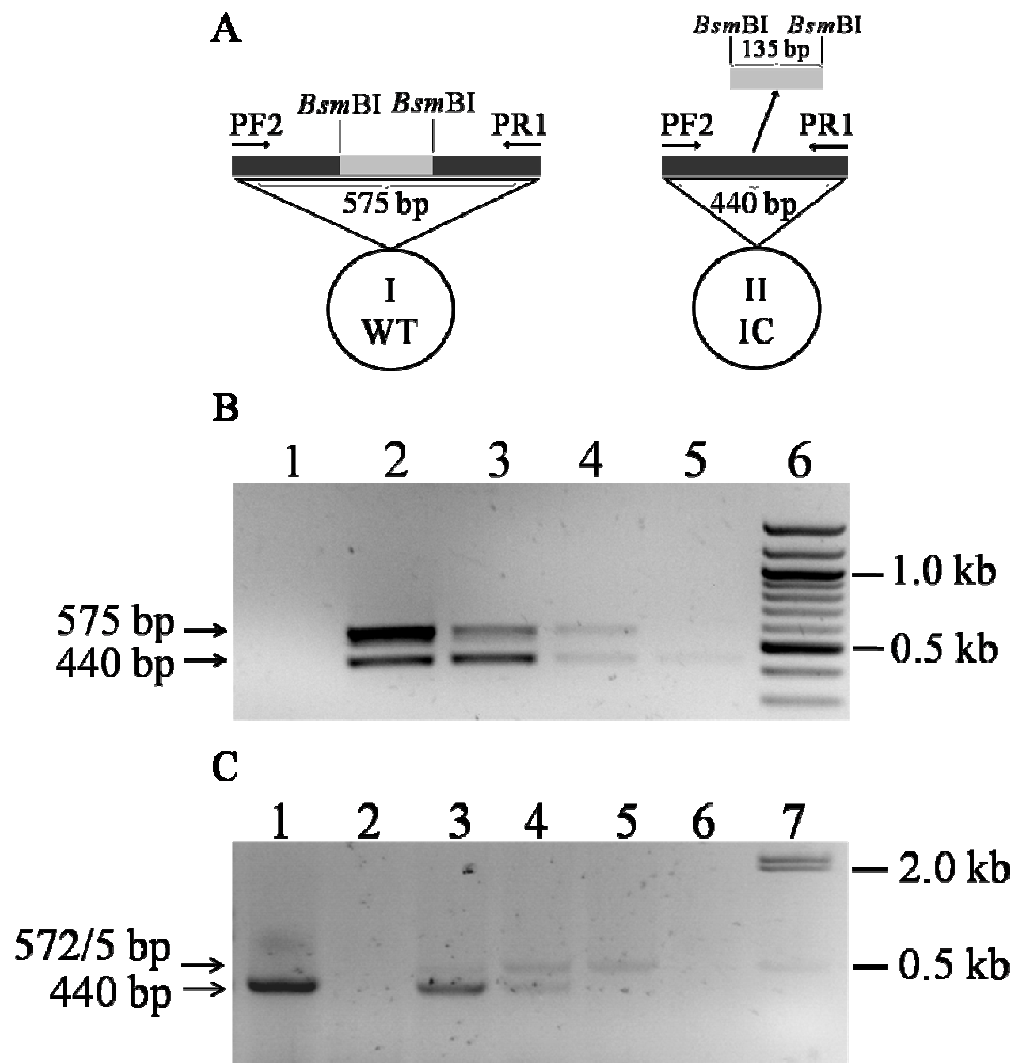


Figure 2

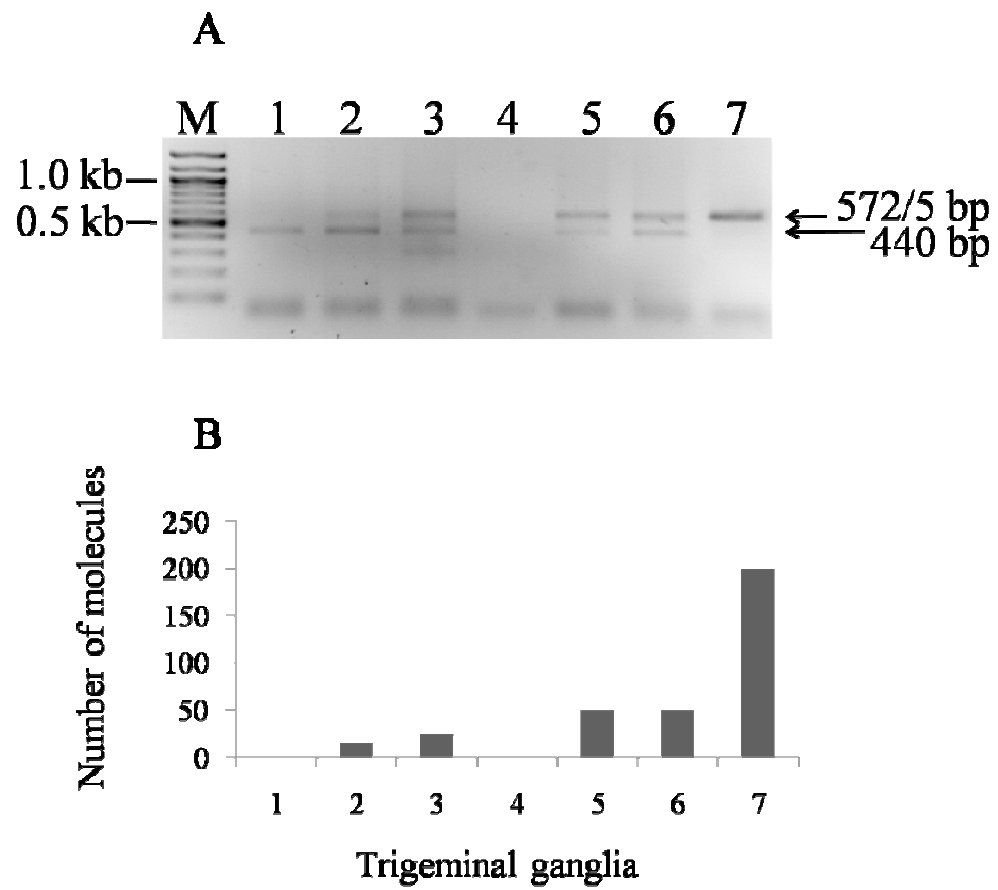
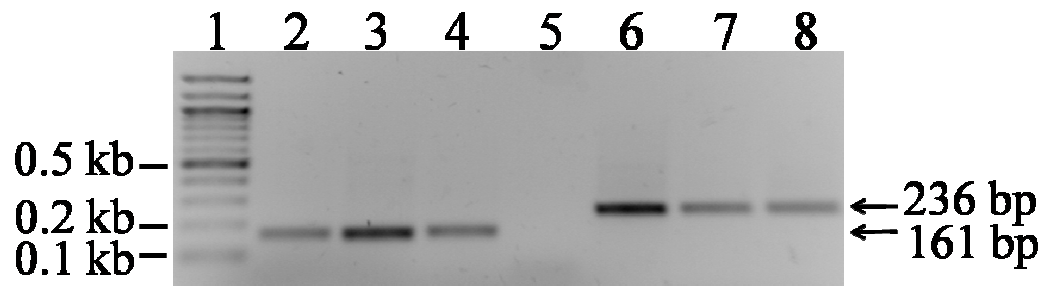


Figure 3



9.1.1 – Resposta dos revisores

Date: 05 Feb 2009
To: "Fabrício Souza Campos" camposvet@gmail.com
From: "VETMIC" vetmic@elsevier.com
Subject: VETMIC-D-08-3127 Revision Requested

Ms. No. VETMIC-D-08-3127

High prevalence of co-infections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil

Veterinary Microbiology

Dear MV Campos,

I can now inform you that the Editorial Board has evaluated your manuscript. The Editor has advised that the manuscript will be reconsidered for publication after major revision.

The comments listed below should be taken into account when revising the manuscript. Along with your revision, you will need to supply a response letter ('Revision Note'), which is a thorough, detailed response to the referees' comments, specifically noting each comment made by the referees and/or Editor, and describing all changes. Should you disagree with any comment(s), please explain why.

Please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for Veterinary Microbiology using the following combination:

<http://ees.elsevier.com/vetmic/>

Your username is: *****

Your password is: *****

You will find your submission record under the menu item, 'Submissions Needing Revision'.

We are looking forward to receiving the revised submission.

Kind regards,

Klaas E. Bij
Editorial Office Manager
Veterinary Microbiology

Reviewer Comments:

Dear Dr. Campos,

Please find enclosed two referees' reports pertaining to your manuscript VETMIC-D-08-3127. As you will read, both are in favour of publication, but they also express concerns about the validity of the data, their interpretation and presentation; they

recommend that the manuscript be reconsidered after major revision.

I should like you to assess the comments and submit a new version of your paper, together with a letter containing detailed statements about how the referees' criticisms have been met. Each comment needs to be addressed - if you have valid scientific reasons not to follow a reviewer's particular suggestion, please explain them. It would be helpful if you highlighted the changes in the original version of your manuscript. Though unlikely, also a revised manuscript may be found unsuitable for publication; in most cases it is either returned to the reviewers for final advice or processed directly. I should add that also inadequate language, poor style, spelling errors might be reasons for rejection; there will be no desk editing and proofreading at ELSEVIER's, and your text will appear in print as you submitted it.

I trust you consider the referees' remarks as helpful.

Prof. Uwe Truyen, Editor-in-Chief (virology)

Reviewer #1: The authors investigated the presence of co-infections with BoHV-1 and BoHV-5 in Brazil, a country showing a significant prevalence of BoHV-5 infection. For their purpose, they design a quantitative PCR to investigate the presence of viral DNA in extracted trigeminal ganglia. The question asked by the authors, namely the presence of coinfections in cattle is scientifically sounded. Their results demonstrate evidence of the presence of such co-infection that is surprisingly very high. There are however a lot of issues, both in the experiments carried out and in the discussion of the results linked with an insufficient reporting of the existing scientific literature. Finally, the discrepancy between the very high (almost 100%) prevalence of positive trigeminal ganglia and the rather low seroprevalence (about 25%) should be carefully analysed before the paper could be accepted.

General comments:

- Both in the introduction and in the discussion, the authors fail to discuss the papers already published on co-infection in alphaherpesviruses, and especially in bovine herpesvirus 1 (for example, Thiry et al., Whetstone et al.).
 - They forget to discuss the data already obtained on BoHV-5 latency and latency sites (for example, Meyer et al., Vogel et al.).
 - They do not discuss the issues linked with co-infection, and mainly the potential rise of recombinant viruses (for example, Meurens et al., Muylkens et al., Schynts et al.).
 - The "virus" neutralisation approach is in fact sero-neutralisation (SN). The results are hardly interpretable. The authors have not the tools to discriminate between anti-BoHV-1 and anti-BoHV-5 antibodies. For that mean, they need to perform cross-neutralisation assays (see papers already published on that). Therefore the results of "sero-neutralisation" cannot be used in the paper and further experiments are needed. One hour incubation period is not enough to have a good sensitivity of the SN.
 - The authors should explain the use of conventional PCR with the internal control. Indeed quantitative PCR is now performed with real time PCR methods.
- I have a more fundamental question about the results: at least 87% (up to 93%) of PCR

positive cattle is enormous, especially compared to the serological results (22-26%). The explanation with canine herpesvirus, proposed by the authors, is not valid, because it is known that antibodies to canine herpesvirus do not persist very long. It is the opposite with BoHV-1 at least, where animals stay very long with specific antibodies. The authors should do a very careful assessment of the specificity of their PCR. Especially getting a so high percentage of positive PCR with trigeminal ganglia, that are not easy samples, needs a very critical appraisal of the results. The authors, with such surprising results, need to provide the scientific community with undoubtful data.

Specific comments:

- introduction: update the herpesvirus classification (Davison et al., 2009);
- materials and methods: to avoid unneeded repetitions (for example between lines 140-142 and 157-159);
- Materials and methods, lines 147-150: not needed;
- NaCl instead of NaCl₂ !
- Discussion: the reference to canine herpesvirus is not well appropriate. The discussed paper shows surprisingly a lot of potential latency sites: so far these data have not been corroborated by additional papers. The authors can take examples from other alphaherpesviruses, that have been consolidated by several papers.
- Discussion: line 262: references are needed to support the statements about BoHV-5 latency: some work has already been done on that subject.
- Table 1: the data cannot be properly understood.

For these reasons, and because the study, that could give valuable results, needs several improvements, I believe that this paper is not acceptable in its present form.

Reviewer #2: Campos et al report on the prevalence of BoHV-1- and BoHV-5-infected cattle in Southern Brazil. While the prevalence of bovine herpesvirus infections is usually monitored by serological assays, these authors chose to collect not only sera but also trigeminal ganglia from healthy cattle at the slaughterhouse. They proceeded then with analysis of these samples by serology (virus neutralization assay) and PCR (amplification of a fragment from the gC gene). By serology, they found that between 25 and 30% of their animals carried detectable levels of neutralizing antibodies against at least one of the two BoHVs. Then, they defined the sensitivity of their PCR at a detection level of >25 target molecules per assay. Using this assay, they found a stunning percentage of 87% animals, which were positive for DNA of at least one of the BoHVs in their trigeminal ganglia. Employing a second PCR, which made use of the first PCR product as the new template, they found that more than 75% of the positive animals actually harbored both BoHV-1 and BoHV-5 DNA in their ganglia. A much lower percentage of the animals were infected with only one of the two viruses.

Overall, the present work is original and of interest to the veterinary field. However, there are some issues that need to be addressed.

Major issues:

1. The discrepancy between seropositive animals and viral-DNA-positive animals is stunning. ELISAs are known to be more sensitive than virus neutralization assays. Furthermore, discrimination between BoHV-1 and BoHV-5 infection may be possible by ELISA (Meyer et al., Arch Virol 2001). These issues need to be addressed in the revised manuscript.
2. Opening of the tubes after the initial PCR may give rise to contamination, which is a danger not only for the upcoming PCR but also for continuing work with the first PCR. This issue needs to be discussed. How did the authors make sure that contamination was not an issue during their work?

Minor issues:

1. The authors do not give credit to at least two others who previously developed discriminatory PCR detection of BoHV-1 and BoHV-5 DNA. Ros et al (J Virol Meth 1999) were the first ones to establish such assays. Their amplification target was also the gC gene and their sensitivity ranged from 6 to 60 molecules per assay. Abril et al (J Virol 2004) established a real-time PCR for the quantification of and discrimination between BoHV-1 and BoHV-5. Their sensitivity ranged from 1 to 10 target molecules per assay. Furthermore, they used the gB gene as target. Using this latter assay would have eliminated the danger of contamination. The principles and results of these two assays should at least be discussed.

10 – VITA

I. Identificação

Nome: **Fabrcio Souza Campos**

Endereço: Praça Conde de Porto Alegre, 77/93 Centro Porto Alegre/RS CEP 90.020-130

Idade: 30 anos

E-mail: camposvet@gmail.com

Tel.: 51 8201 7022

II. Documentação

Possui carteira de habilitação - categoria: B.

Situação militar: dispensa de incorporação.

III. Formação profissional

2009 - atual: Doutorado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2007 - 2009: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

2002 - 2006: Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas/RS.

1994 - 1996: Curso de Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes/MG.

IV. Formação complementar

2008: Participação do XIV Encontro Nacional de Virologia. Local: Caxambu/MG.

2007/2008: Organização do I e II Simpósio de Microbiologia Aplicada. Local: UFRGS.

2006: Curso de Bioinformática e Biologia Computacional Aplicada. Local: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul / RS.

V. Outros conhecimentos

Compreensão escrita da Língua Inglesa. Compreensão escrita e oral da Língua Espanhola.

Noções intermediárias sobre informática com bons conhecimentos de Ms Office (Word, Excel, PowerPoint, Publisher) e internet.

VI. Experiência Profissional

2009 - atual: Desenvolvimento e teste de vacinas contra infecções por BoHV-5.

2007 - 2008: Padronização de técnica molecular no diagnóstico de infecções por BoHV-1 e BoHV-5.

2006: Estágio curricular no Laboratório de Virologia ICBS / UFRGS. Carga horária: 616 horas.

2001 - 2002: Responsável técnico da empresa City&Garden (Pouso Alegre, Minas Gerais).

VII. Prêmios

2007: Menção Honrosa - 1º lugar no Curso de Medicina Veterinária da turma 2006/2, Universidade Federal de Pelotas.

VIII. Palestras

2008: Expointer/2008 - Epidemiologia e distribuição de Herpesvírus bovinos tipos 1 e 5.

2008: 35º CONBRAVET - Prevalência molecular de BoHV-1 e BoHV-5 em matadouros.

IX. Publicações

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. High prevalence of coinfections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.** "in press" 2009.